

549 587  
Rec'd /PTO 13 SEP 2005

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 9 月 23 日 (23.09.2004)

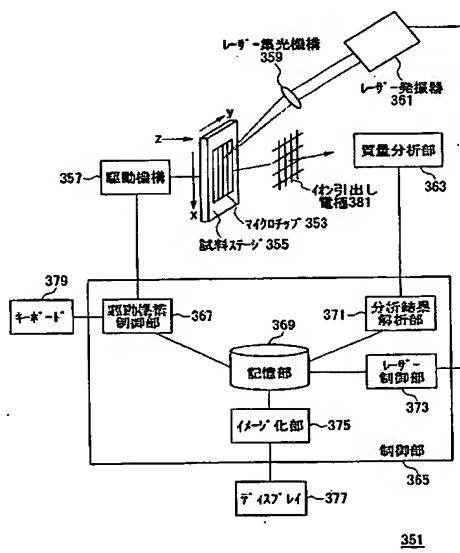
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/081555 A1

(51) 国際特許分類:	G01N 27/64, 30/60, 30/56, 30/72, 37/00, 27/447	1088001 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞ヶ関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP2004/003427	(72) 発明者; および
(22) 国際出願日:	2004 年 3 月 15 日 (15.03.2004)	(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 勝利 (TAKA-HASHI, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海 2-41-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 飯田 一浩 (IIDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 雅和 (BABA, Masakazu) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 井口 審幸 (IGUCHI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 佐野 亨 (SANO, Toru) [JP/JP];
(25) 国際出願の言語:	日本語	[統葉有]
(26) 国際公開の言語:	日本語	
(30) 優先権データ: 特願2003-069793	2003 年 3 月 14 日 (14.03.2003) JP	
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒		

(54) Title: MASS SPECTROMETRIC SYSTEM AND MASS SPECTROMETRY

(54) 発明の名称: 質量分析システムおよび分析方法



- 361... LASER OSCILLATOR
- 359... LASER LIGHT CONDENSING MECHANISM
- 357... DRIVING MECHANISM
- 355... SAMPLE STAGE
- 353... MICROCHIP
- 381... ION LEAD OUT ELECTRODE
- 363... MASS SPECTROMETRIC SECTION
- 379... KEYBOARD
- 367... DRIVING MECHANISM CONTROL SECTION
- 369... STORAGE SECTION
- 375... IMAGING SECTION
- 377... DISPLAY
- 371... ANALYTIC RESULT ANALYZING SECTION
- 373... LASER CONTROL SECTION
- 365... CONTROL SECTION

(57) Abstract: After a sample is separated into a plurality of components in a channel formed in advance in a microchip (353), the channel is irradiated with laser light from a laser oscillator (361) along the separating direction, thus ionizing respective fractions separated in the channel sequentially. Ionized fragments are detected at a mass spectrometric section (363) and analyzed at an analytic result analyzing section (371). Analytic results are stored in a storage section (369) while being associated with the positional information at a driving mechanism control section (367) and the information on laser light irradiation conditions at a laser control section (373) and then imaged at an imaging section (375). Imaged analytic results are displayed on a display (377).

(57) 要約: マイクロチップ (353) に形成された流路において予め試料を複数の成分に分離した後、分離方向に沿って流路にレーザー発信器 (361) からレーザー光を照射し、流路で分離された各画分を順次イオン化する。イオン化されたフラグメントを質量分析部 (363) にて検出し、分析結果解析部 (371) にて解析する。解析結果は、駆動機構制御部 (367) における位置情報、レーザー制御部 (373) におけるレーザー光照射条件の情報と関連づけられて記憶部 (369) に保存され、イメージ化部 (375) にてイメージ化される。イメージ化された解析結果は、ディスプレイ (377) に表示される。

WO 2004/081555 A1



〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 川浦 久雄 (KAWAURA, Hisao) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 阪本 利司 (SAKAMOTO, Toshitsugu) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 服部 涉 (HATTORI, Wataru) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 染谷 浩子 (SOMEYA, Hiroko) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 速水 進治 (HAYAMI, Shinji); 〒1500021 東京都渋谷区恵比寿西2-17-16 代官山TKビル1階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 補正書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

## 明細書

## 質量分析システムおよび分析方法

## 5 技術分野

本発明は、質量分析システムおよび分析方法に関する。

## 背景技術

細胞等の生体試料やタンパク質、核酸など生体物質の分析では、分析に先立ち試料をあらかじめ分離精製する操作や、試料をサイズや電荷に応じて分離する操作が行われる。たとえば、プロテオミクス解析において、分離された成分の解析には、通常、質量分析が用いられている。質量分析に供する試料に含まれる成分がタンパク質、核酸、多糖等の生体成分である場合、従来は生体試料から目的成分をあらかじめ単離する必要があった。たとえば、複数の成分が含まれる試料の解析を行う場合、試料を精製し、二次元電気泳動法などによって成分毎に分離を行い、分離された各スポットから各成分を回収し、回収した成分を用いて質量分析用の試料を作製していた。このため、分離過程と試料作製過程とを別々に行う必要があり、操作が煩雑であった。

こうした操作の煩雑さを解消することを目的として試料中の成分の分離と質量分析を効率よく行う方法が検討されている（特許文献1、2）。特許文献1および2には、電気泳動を行う電気泳動管（キャピラリーチューブ）と質量分析を行うためのイオン化部とを一体化し、電気泳動と質量分析を連続的に行うようにした質量分析装置が記載されている。しかしながらこの種の装置では、電気泳動管から回収された成分について逐一質量分析を行うことが必要となるため、分析効率の点で改善の余地を有していた。また、装置構成が大がかりなものになり、省スペース化の観点からも改善の余地を有していた。

一方、近年、生体由来物質の分離または分析機能をチップ上に具備するマ

イクロチップの研究開発が活発に行われている。特許文献3には、マイクロチップを用いた質量分析方法が記載されている。この方法は、基板の底面に吸着剤を結合させたプローブを設けておき、基板とサンプルを接触させることによりサンプル中の特定の成分を吸着剤に吸着させて成分の分離を行つた後、プローブごとに質量分析を行う方法である。  
5

ところが、特許文献3に記載の方法では、試料中のそれぞれの成分について対応する吸着剤を選定し、選定した吸着剤を固定化したプローブ基板を作製する必要があった。また、プローブ上に試料をスポットした後、不要な成分を洗浄除去する必要があった。また、その後、吸着した成分のイオン化を  
10 プローブごとに順次行い、質量分析を行っていた。このため、試料の分離と分析とが連続的でなく、操作も比較的煩雑であった。

特許文献1 特開平5-164741号公報

特許文献2 特許第2572397号明細書

特許文献3 特開2001-281222号公報

15

## 発明の開示

本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、試料の分離および質量分析を効率的に精度よく行う技術を提供することにある。

本発明によれば、試料の通る流路および該流路に設けられた試料分離領域を有するマイクロチップと、前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、を備えることを特徴とする質量分析システムが提供される。  
20

本発明の質量分析システムは、試料分離領域に分離された試料を直接イオニ化し、そのフラグメントを分析するように構成されている。このため、本発明の質量分析システムによれば、マイクロチップ上の位置Aと分子量Bの  
25 2つのパラメータによる2次元プロファイルを得ることができる。図82(a)、図82(b)は、こうした2次元プロファイルの例である。この例

では、後述するように、試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射して質量分析を行い、マイクロチップ上の位置Aおよび分子量Bに基づく2次元プロファイルを得ている。

このようなプロファイルを利用すれば、質量分析によって成分の同定を行うことなく様々な情報を得ることが可能となる。たとえば、被験者の血液を分析し、ある病気のスクリーニングを行うにあたって、健康な人のプロファイルおよび罹患した人のプロファイルを参照データとし、被験者の血液から得られた2次元プロファイルを対照することにより、成分分析をすることなくスクリーニングを行うことが可能である。

また、本発明の質量分析システムにおいては、試料が、試料分離領域において、その特性にしたがって分離される。そして、試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながら分離された試料にレーザー光を照射し、質量分析を行うことができる。このため、分離された試料を分離された位置から移動させることなくイオン化し、質量分析を行うことができる。よって、分離された試料を分離された位置から抽出する過程が不要となるため試料の損失が生じず、試料が少量である場合にも、確実に分離を行い、高い精度で質量分析を行うことができる。なお、本発明において、「試料分離領域に沿って光照射位置を移動させる」とは、試料分離領域に対するレーザーの相対的位置を移動させることをいい、レーザー光の照射方向または照射角度を変更することも含む。

このように、本発明に係る質量分析システムによれば、試料分離領域に沿って直接レーザー光を照射して試料をイオン化し、質量分析を行うことができるため、試料分離領域に分離された各成分の質量分析スペクトルを効率よく取得することができる。

また、本発明の質量分析システムにおいて、前記解析手段は、前記光照射位置と該光照射位置に対応する前記質量分析データとを関連づけて記憶するデータ記憶部を備えていてよい。

こうすることにより、各成分の分離位置と、その成分の質量分析スペクト

ルとを組み合わせて効率よく解析を行い、成分ごとのスペクトル特性を網羅的に取得することができる。よって、取得された情報に基づき、試料中の成分の同定等を精度よく迅速に行うことができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は、前記試料の分子量、等電位点または表面の疎水性に応じて前記試料を分離し、前記光照射手段は、前記試料分離領域中に分離された前記試料に沿って前記光照射位置を移動させながら前記レーザー光を照射するように構成されてもよい。こうすることにより、複数の成分を含む試料を成分の特性に従って確実に分離し、質量分析を行うことができる。また、成分の特性と各成分の質量分析スペクトルとを組み合わせて効率よく解析することができるため、成分の同定等を迅速に行うことができる。

以上述べた質量分析システムにおいて、試料が試料分離領域において質量分析に適した形態で分離されるように構成することが重要な技術的課題となる。たとえば、試料分離領域にレーザー光を照射した際、試料分離領域の構成部材がイオン化されないようにすることが望ましい。また、レーザー光を照射した際、試料が速やかにイオン化され、フラグメントが質量分析装置内部に円滑に移動するような装置構成となっていることが望ましい。こうした観点からは、従来用いられている流路中にポリマーゲルを充填した試料分離領域は、ポリマーゲルの一部がレーザー照射によりイオン化すること、また試料由来のフラグメントが効率よく放出されないこと等の問題があり、本発明の試料分離領域として用いるには、必ずしも適しているとはいえない。すなわち、本発明においては、従来の分離装置に用いられている構成とは異なる観点から試料分離領域の設計を行うことが重要となる。こうした試料分離領域を採用することにより、試料分離に係るマイクロチップ上の位置Aと質量分析に係る分子量Bの2つのパラメータを含む多角的なデータが精度良く得られ、従来にない新規な分析を実現することができる。以下、本発明の原理による質量分析に適した構成の試料分離領域の構成について説明する。

本発明の質量分析システムにおいて、前記流路が基板の表面に設けられており、前記試料分離領域は複数の柱状体を有することができる。こうすると、隣接する柱状体間の間隙が篩としての役割を果たす。本発明においてはこのような方式により試料分離が行われるので、たとえば核酸やタンパク質等、  
5 従来では分離困難であったさまざまな微小サイズの物質を分離、分別することができます。なお本発明において、複数の柱状体とは、分離機能を発揮する  
ことができる程度の数の柱状体のことをいう。

また、試料分離領域を柱状体とすることにより、分離された試料にレーザー光を照射して、効率よくイオン化することができる。このとき、電気泳動  
10 等、ゲルやビーズ等の充填剤を用いる従来の分離方法に比べ、分離時には液体試料が分離用流路内に保持されて乾燥が抑制されるとともに、レーザー光照射時の気化がスムーズに行われる。また、充填剤を用いた場合、充填剤がイオン化することにより測定精度が顕著に低下する場合がある。本発明に係  
15 る柱状体を用いる構成によれば、こうした問題を解消することができ、精度の高い分析が可能となる。また、試料由来のフラグメントが試料分離領域から効率よく放出され、この点からも分析の高精度化が図られる。さらに、この構成によれば、柱状体の間隔や配置を適宜に設計することにより、たとえばタンパク質等のうち、比較的サイズの大きい分子も測定可能となる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は、複数の前記柱状体が配設された柱状体配設部を複数含み、隣接する前記柱状体配設部間に前記試料が通過するパスが設けられた構成とすることができる。こうすることにより、被分離対象となる物質の大きさが小さいほど、試料分離領域中で柱状体にトラップされ、長い経路を通過することになる。すなわち、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となるので、目詰まりの問題が低減され、スループットが顕著に改善される。よって、核酸やタンパク質等の分離に好適に適用できる。このため、これらを含む試料の質量分析をさらに確実に行うことができる。このような構成を採用

した場合、サイズの大きい成分とサイズの小さい成分が混在した試料を測定対象とした場合でも、試料中の各成分が試料分離領域で好適に分離される。この結果、一度の分析で効率良く分析データを得ることができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記バスの幅は、前記柱状体配設部5中の前記柱状体間の平均間隔よりも大きくすることができる。このようになると、大きいサイズの物質は試料分離領域中のバスの部分を円滑に通過するとともに、小さいサイズの物質は柱状体配設部を通り、そのサイズに応じて長い経路を経た末に試料分離領域を通過する。

本発明の質量分析システムにおいて、平面配置が略菱形になるように複数10の前記柱状体配設部が組み合わせて配置され、それぞれの前記柱状体配設部の平面配置が略菱形となるように、前記柱状体が配置されていてもよい。こうすることにより、さらに分離能を向上させることができる。

また、本発明の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に高くなっていてもよい。15このようにすることにより、柱状体配設部に捕捉された分子の柱状体配設部における滞在時間が長くなるため、柱状体配設部に捕捉されない分子との保持時間の差が顕著となる。そのため、分離能の向上を図ることが可能となる。

また逆に、本発明の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に低くなっていてもよい。20この場合、柱状体配設部における目詰まりが抑制されるため、スループットの向上を図ることができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域と、前記試料分離領域よりも前記柱状体が疎に形成された調整領域とが、前記流路中の前記試料の進行方向に対して交互に形成された構成とすることができる。25このような構成とすれば、分離された各バンドの形状をより一層直線的にすることができます。よって、バンドの濃縮が可能となり、各バンドの質量分析を行った際に、精度よく検出することができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記柱状体の表面に金属層が設けら

れていてもよい。また、本発明の質量分析システムにおいて、前記柱状体は金属により構成されてもよい。柱状体の少なくとも表面を金属とすることにより、柱状体の表面に表面プラズモン波が発生するため、試料のイオン化効率が向上する。また、柱状体の表面に強電界を発生させることができる。このため、イオン化した試料の引き出し効率を向上させることができる。なお、この場合において、柱状体の断面形状が、頂部よりも底部において幅広となっていることが好ましい。こうすれば、柱状体の頂部に電界を集中させ、イオン化した試料の引き出し効率をより一層向上させることができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記レーザー光は、赤外光レーザーまたは紫外光レーザーであってもよい。こうすることにより、比較的分子サイズの大きいタンパク質や核酸等の生体高分子をより一層確実にイオン化することができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は複数の凹部を有する構成とすることができます。このような構成とすると、被分離対象となる物質のサイズが小さいほど、試料分離領域中で凹部にトラップされ、長い経路を通ることになる。すなわち、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過するので、目詰まりの問題が低減され、スループットが顕著に改善される。特に核酸やタンパク質等の分離においては、分子の慣性半径もきわめて広い範囲に及ぶため、巨大サイズの物質が目詰まりしやすく、また、いったん、こうした物質が目詰まりすると、洗浄しても脱離させることが困難となる。本発明によれば、このような問題が解決されるため、核酸やタンパク質等の分離に好適に適用できる。

また、本発明において、複数の凹部とは、分離機能を担保しうる程度の数の凹部のことをいう。本発明においては、この凹部の開口部最大径をきわめて狭く設定することもできる。この場合、従来では予想すらできなかつたさまざまな物質を分離、分別することができる。たとえば核酸やタンパク質の分離に際しては、上記凹部が数百ナノメートルオーダー以下の微小な開口部

を有することが望まれる。

開口部の形状は、例えば円形、橢円形、多角形などいずれでもよく、特に制限されない。本発明において凹部の開口部最大径とは、開口部の一点と他の一点とを結んでできる任意の直線のうち最も長い直線の長さをいう。また、  
5 本発明において凹部の深さ方向は必ずしも重力と同じ方向である必要はない。たとえば流路壁面に水平方向に凹部が設けられていてもよい。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域中に、複数の前記凹部が設けられた突起部を具備する構成とすることができる。こうすることにより、凹部を有する表面の面積を増大させることができるために、分離能が  
10 向上する。

本発明の質量分析システムにおいて、陽極酸化法により前記凹部が形成された構成とすることができます。陽極酸化法によれば、所望のサイズの凹部および凹部の間隔を有する試料分離領域が少ない工程で実現できる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面が親水化された構成とすることができます。また、本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面が撥水化された構成とすることができます。こうすることにより、試料成分の流路内壁への非特異的な吸着を抑制することができる。このため、試料の損失や分離精度の低下を抑制し、良好な分離能を発揮することができる。また、試料の損失が抑制されるため、質量分析の精度を向上させることができる。  
20

たとえば、本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面に親水性物質を付着させることにより、前記流路の内壁が親水化されていてよい。

また、本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の表面にシリコン熱酸化膜を形成することにより、前記流路の内壁が親水化されていてよい。  
25 热酸化膜を形成することにより、試料の流路壁への非特異的な吸着が抑制される。また、レーザー光を照射した際の、試料分離流路表面に付着した親水性物質のイオン化が抑制される。このため、質量分析のバックグラウンドを

減少させ、測定精度をさらに向上させることができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域の表面は、離間して配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く前記試料分離領域の表面を占める第二の領域と、を有し、前記第一の領域および前記第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であってもよい。具体的には、

- ( i ) 第一の領域を疎水性領域とし、第二の領域を親水性領域とする構成
- ( i i ) 第一の領域を親水性領域とし、第二の領域を疎水性領域とする構成のいずれかを採用することができる。なお、本発明における親水性領域とは、疎水性領域よりも親水性が高い領域のことをいう。親水性の程度はたとえば水接触角の測定により把握することができる。

以下、本発明における試料の分離の原理について、上記 ( i ) の場合を例に挙げて説明する。この場合、分離対象となる試料を、比較的親水性の高い溶媒中に溶解または分散させた状態として流路内に導入する。このような溶媒は、試料分離領域において、疎水性領域（第一の領域）の表面を避け親水性領域（第二の領域）にのみ分布する。したがって、疎水性領域の間隙部が分離対象となる試料の通過する経路となり、この結果、疎水性領域間の間隔と試料のサイズとの関係によって試料分離領域の通過に要する時間が決定されることとなる。これにより、サイズに応じて試料の分離がなされる。

また、本発明においては、サイズに応じた分離のほか試料の極性に応じた分離もなされる。すなわち、親水性／疎水性の程度の異なる複数種類の試料を分離することができる。上記 ( i ) の例では、疎水性の高い試料は疎水性領域に捕捉されやすく流出時間が比較的長くなる一方、親水性の高い試料は疎水性領域に捕捉されにくく、流出時間が比較的短くなる。このように本発明は、試料のサイズだけでなく極性をも含めた分離がなされ、従来では分離困難であった多成分系の分離を実現することができる。

本発明の場合、障害物となる構造体により分離を行う方式とは異なり、流路表面に設けられた試料分離領域を分離手段とする。たとえば従来用いられ

ている膜分離の場合は膜中の細孔の大きさを精度良く制御することが必要となるが、所望のサイズ、形状の細孔を有する膜を安定的に製造することは必ずしも容易ではない。これに対し本発明は、流路の表面処理により試料分離領域を形成することができ、第一の領域の間隔を制御することによって所望の分離性能が得られるため、分離目的に応じた適切な構成を比較的容易に実現することができる。  
5

たとえば、本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、  
10 前記親水性領域が配置された前記試料分離領域が形成されてもよい。この場合、マスク開口幅を調整することで容易に疎水領域間の間隔を調整できる。すなわち、分離目的に応じて疎水領域間の間隔を適宜に調整し、分離目的に応じた試料分離領域の構成とすることができる。特に、タンパク質やDNAの分離においては、巨大サイズの物質の分離からナノオーダーの物質の分離  
15 まで、様々なサイズの物質の分離が求められる。このうちナノオーダーの物質を高い分離能で短時間のうちに分離を行うことは、従来技術ではきわめて困難であった。本発明においては、第一の領域間の間隔を狭くすることで分離サイズを狭くすることができる。第一の領域間の間隔は、微細加工技術を利用することにより容易に実現できることから、ナノオーダーサイズの物質の分離を好適に実現することができる。また、本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、前記疎水性領域が配置された前記試料分離領域が形成されてもよい。  
20

25 またこの構成とすれば、少量の試料で短時間に分離を行うことができる。本発明による分離は、試料分離領域の表面特性によって分離を行うものであるので、精密な分離を実現できる上、試料のロスが少ないので、少量の試料でも充分に高い分解能を実現でき、また、優れた分解能を実現することができ

きる。さらに本発明においては、試料を通過する流路の表面特性によって分離が行われるため、目詰まり等の問題が少ない。また、使用後、試料分離領域の表面に洗浄液を流す等の方法によってきわめて容易に洗浄することができる。

5 本発明においては、隣接する第一の領域間の距離と、液体に含まれる分離対象の試料サイズとの関係により、様々な機能の分離を実現することができる。試料サイズが上記距離よりも大きい場合、試料分離領域は試料濃縮装置としての機能を果たす。試料分離領域はフィルタとして作用し、試料分離領域上流側で当該試料が堰き止められる。この結果、試料分離領域の上流側において試料が高濃度に濃縮される。一方、試料サイズが上記距離よりも小さい場合、試料分離領域は試料分別機能を果たし、試料分離領域中において、サイズや親水性の程度等に応じて試料が分別される。この結果、試料分離領域下流側に、分別された試料が流出することとなる。

10 本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域を複数備えた構成とすることができる。こうすれば、試料分離領域の設計の自由度がさらに広がり、試料に最適な試料分離領域の形状を選定することができる。このため、分離能をより一層向上させることができる。たとえば、本発明の質量分析システムにおいて、前記複数の試料分離領域がストライプ状に配置されていてもよい。

15 本発明の質量分析システムにおいて、前記疎水性領域は、疎水基を有する化合物を含む膜により構成されてもよい。また、前記疎水基を有する化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であってもよい。また、シリコーン化合物であってもよい。

20 本発明の質量分析システムにおいて、ポリジメチルシロキサンブロックを親水性の前記流路の表面に接触させることにより、前記疎水性領域が形成された構成とすることができます。ポリジメチルシロキサンのブロックを流路の表面に接触させると、被接触部を選択的に疎水化することができる。このため、疎水性領域を確実かつ簡便に形成することができる。

また、本発明の質量分析システムにおいて、液状シリコーン化合物を親水性の前記流路の表面に印刷することにより、前記疎水性領域が形成された構成とすることができます。ここで、液状シリコーン化合物として、たとえばシリコーンオイルを用いることができる。この方法によれば、簡便な工程で、  
5 疎水表面および親水表面の混在したパターンを形成することができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記親水性領域は、親水基を有する化合物を含む膜により構成されてもよい。また、前記親水基を有する化合物は、親水基を有するシランカップリング剤であってもよい。

本発明の質量分析システムにおいて、前記流路が複数設けられ、これらの  
10 前記流路と交差する液体試料導入用流路が設けられた構成とすることができる。このような構成とすれば、1箇所に試料を導入することにより上記複数の流路に試料を導入することが可能であるため、分析の効率を大幅に向上させることができ。ここで、流路および液体試料導入用流路が交差する箇所と試料分離領域との間に、複数の柱状体が配設されている構成としてもよい。この場合、試料中の分子は、複数の柱状体が配設されている領域を経由して分離領域に至る。このため、流路に流れ込む分子のサイズを制限することが可能になる。よって、所望のサイズの分子についての質量分析を迅速かつ正確に実現することができる。

本発明の質量分析システムにおいて、柱状体が一列に配設された堰止部を  
20 さらに有することができる。こうすることにより、拡散した試料を当該堰止部に隣接する一定の領域に集積することができる。分離に先立ち、試料を一定の領域に集積し、試料のバンドを細くすることができるので、分離能の向上が可能である。

本発明の質量分析システムにおいて、前記堰止部が前記試料分離領域に隣接して配設されていてもよい。こうすれば、試料が試料分離領域を通過する前に、試料のバンド幅を細くすることができるため、分離能が向上する。そのため高精度の分離を実現することが可能である。また、分離した試料のバンド幅も細くなるため、分離された試料を濃縮することができる。このため、

質量分析測定をより一層確実に行うことができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域が、スリットを介して複数に分割された構成とすることができる。スリットは単一または複数のいずれでもよい。このような構成とすることにより、検出部でのバンドの  
5 形状が直線的となり、検出領域を広げることが可能となり検出感度を向上することができる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料に外力を付与して前記試料を前記流路中で移動させる外力付与手段をさらに備えた構成とすることができる。このようにすれば、外力を負荷する程度に応じて分離精度および分  
10 離に要する時間を目的に応じて適切に設定することができる。ここで、外力としては、圧力や電気力を用いることが便利である。大がかりな外力付与部材が不要だからである。

また、毛細管現象を利用して試料を移動させることもできる。こうすれば、外力付与手段を設ける必要がなくなるため、システムの構成を簡素化する  
15 ことができるとともに、分離操作を簡便に行うことができる。このため、分離操作およびこれに引き続いて行われる質量分析操作をさらに効率よく行うことができる。たとえば質量分析を行うチャンバ内で容易に分離操作を行うことができる。また、本発明の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域に微細流路を形成し、前記流路から前記微細流路を経由して前記試料分離  
20 領域に、前記試料が毛細管現象により導入されるように構成してもよい。

本発明の質量分析システムにおいて、前記流路の上部が、質量分析用マトリックスを含む薄膜によって被覆されていてもよい。こうすることにより、分離時に流路中の試料が乾燥することを好適に抑制することができる。また、分離後は被覆を除去せずにレーザー光を照射すればよく、試料に予めマトリックスを混合したり、試料の分離後、試料分離領域にマトリックスを添加したりする操作が不要となる。

本発明によれば、基板と、該基板上に試料吸着用粒子を付着させ、試料を特定の性状にしたがって展開するようにした試料分離領域と、前記試料分離

領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、を備えることを特徴とする質量分析システムが提供される。本発明において、展開とは、試料の性状にしたがって、試料分離領域に試料を分布させることをいい、分離は展開の一態様である。

基板に試料吸着用粒子を付着させた試料分離領域は、流路中に微細加工を施す場合よりも簡便な方法で容易に形成することができる。そして、たとえば試料を展開するための展開液と試料との親和性に応じて試料を展開することができる。また、試料を極性に応じて展開することも可能となる。このため、試料を確実に分離することができる。また、本発明によれば、試料をある程度乾燥させた状態で分離を開始することができる。このため、試料のバンド幅を細くすることが可能となる。

本発明の質量分析システムにおいて、前記試料吸着用粒子がシリカゲルであってもよい。こうすることにより、試料を吸着用粒子に確実に吸着させながら、展開液の性状に応じて確実に展開することができる。

本発明によれば、試料分離領域を有するマイクロチップを用いて質量分析を行う分析方法であって、試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を分離するステップと、前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、を含むことを特徴とする分析方法が提供される。

また、本発明によれば、試料分離領域を有する基板を用いて質量分析を行う分析方法であって、試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を展開するステップと、前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、を含むことを特徴とする分析方法が提供される。

本発明に係る分析方法においては、分離または展開された試料中の各成分

の位置と、その成分の質量分析スペクトルとを組み合わせて解析を行うことができる。このため、成分ごとのスペクトル特性を効率よく網羅的に取得することができる。よって、取得された情報に基づき、試料中の成分の同定等を精度よく迅速に行うことができる。

5 本発明の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含み、第一の質量分析データを得るステップと、試料を分離する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて前記試料  
10 の同定を行うステップと、を含んでもよい。

また、本発明の分析方法において、試料を展開する前記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含み、第一の質量分析データを得るステップと、試料を展開する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて前記試料の同定を行うステップと、を含んでもよい。

分析に供する試料を分離または展開する前に低分子化する場合、試料中の成分が混合された状態で低分子化されるため、分離または展開された断片が試料中のどの成分由来であるかを判断することが困難であった。これに対し、本発明においては、試料は予め分離または展開された後、試料分離領域中から移動させることなく低分子化されるため、試料中に含まれる成分ごとに、低分子化された断片についての質量分析データを得ることができる。このため、より一層詳細な解析が可能となる。また、分離または展開された試料中の各成分を低分子化することにより得られる第一の質量分析データと、低分子化せずに得られる第二の質量分析データとを組み合わせて試料の同定がなされる。このため、試料中の各成分について、より精度が高く詳細な情報

を得ることができる。

本発明の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、分離された前記試料を前記試料分離領域に固定化するステップを含んでもよい。また、本発明の分析方法において、

5 試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、展開された前記試料を前記試料分離領域に固定化するステップを含んでもよい。

こうすることにより、分離または展開された位置に試料を固定化した状態でレーザー光を照射することができる。このため、分離または展開された試  
10 料の試料分離領域中での拡散が抑制され、分離または展開された位置情報に  
関する精度を向上させることができる。また、試料を低分子化する際にも、  
低分子化する前に試料分離領域に固定化しておくことにより、低分子化した  
試料の拡散が抑制され、より精度の高い情報を取得することが可能となる。

本発明の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含んでもよい。また、本発明の分析方法において、試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含んでもよい。こうすることにより、分離または展開された試料に簡便に質量分析用マトリックスを添加することができる。よって、マトリックス支援型の質量分析を効率よく行うことができる。

なお、これらの各構成の任意の組み合わせや、本発明の表現を方法、装置などの間で変換したものもまた本発明の態様として有効である。

以上説明したように本発明によれば、試料の分離および質量分析を簡便に精度よく行う技術が実現される。具体的には、成分の同定を行うことなく分析対象についての詳細情報を得ることのできる新規な質量分析方法およびこれを実現するシステムが実現される。

### 図面の簡単な説明

上述した目的、およびその他の目的、特徴および利点は、以下に述べる好適な実施の形態、およびそれに付随する以下の図面によってさらに明らかになる。

5 図1は、本実施形態に係る質量分析システムの構成を示す図である。

図2は、図1の質量分析システムを用いた質量分析方法を示す図である。

図3は、図1の質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図4は、図3のマイクロチップの液溜めの構造を説明するための図である。

10 図5は、図4のA-A'断面図である。

図6は、図3中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

図7は、図6の分離用流路の断面図である。

図8は、試料の分離方式を説明するための図である。

図9は、マイクロチップに緩衝液を導入する方法を説明する図である。

15 図10は、マイクロチップに形成されるナノ構造体の断面図である。

図11は、図10に示したナノ構造体の形成方法を説明するための図である。

図12は、図10に示したナノ構造体の形成方法を説明するための図である。

20 図13は、図10に示したナノ構造体の形成方法を説明するための図である。

図14は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図15は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図16は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

25 図17は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図18は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図19は、マイクロチップの分離用流路の製造方法を説明するための図である。

図20は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図21は、図1の質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図22は、電気浸透流を調節するための補正電圧の印加方法を示す図である。  
5

図23は、図1の質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図24は、マイクロチップに用いるジョイントの具体的な構造を示す図である。

10 図25は、試料の分離方式を説明するための図である。

図26は、マイクロチップの分離用流路の製造方法を説明するための図である。

図27は、マイクロチップの分離用流路の製造方法を説明するための図である。

15 図28は、柱状体の配列方法の一例を示した図である。

図29は、柱状体の配列方法の一例を示した図である。

図30は、ピラーパッチの配置を示す平面図である。

図31は、ピラーパッチの配置を示す平面図である。

図32は、柱状体の配列方法の一例を示した図である。

20 図33は、柱状体の配列方法の一例を示した図である。

図34は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図35は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

25 図36は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図37は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図38は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図39は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

5 図40は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図41は、流路構造の一例を示す図である。

図42は、流路構造の一例を示す図である。

図43は、図3中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

10 図44は、図3中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

図45は、試料の分離方法を説明するための図である。

図46は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

図47は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

図48は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

15 図49は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

図50は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

図51は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

図52は、試料分離領域中の凹部の配置を示す図である。

20 図53は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの凹部の形状を説明するための図である。

図54は、マイクロチップの分離用流路の構成の一例を示す図である。

図55は、マイクロチップの分離用流路の構成の一例を示す図である。

図56は、マイクロチップの分離用流路の構成の一例を示す図である。

図57は、基板への凹部の作製工程を説明するための図である。

25 図58は、ポーラスアルミナを説明するための図である。

図59は、アルミニウム層の周辺部が絶縁膜で覆われた状態を示す図である。

図60は、本実施形態に係るマイクロチップ中の分離用流路の構造を詳細

に示した図である。

図 6 1 は、本実施形態に係るマイクロチップ中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

図 6 2 は、試料の分離方法を説明するための図である。

5 図 6 3 は、試料の分離方法を説明するための図である。

図 6 4 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 6 5 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 6 6 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 6 7 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

10 図 6 8 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 6 9 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 7 0 は、マイクロチップの製造方法を説明するための図である。

図 7 1 は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの概略構造を示す断面図である。

15 図 7 2 は、マイクロチップの流路の構成の一例を示す図である。

図 7 3 は、マイクロチップの流路の構成の一例を示す図である。

図 7 4 は、マイクロチップの流路の構成の一例を示す図である。

図 7 5 は、ピラーメッシュの機能を説明するための図である。

20 図 7 6 は、本実施形態に係る質量分析システムに用いるマイクロチップの構成を示す図である。

図 7 7 は、本実施形態に係る質量分析システムの構成を示す図である。

図 7 8 は、図 7 7 の質量分析システムの制御方法を説明する図である。

図 7 9 は、本実施形態に係る質量分析方法を説明する図である。

図 8 0 は、本実施形態に係る質量分析方法を説明する図である。

25 図 8 1 は、本実施形態に係る質量分析により得られたフラグメントパターンの解析方法を説明する図である。

図 8 2 は、本実施形態に係る質量分析システムにより得られるフラグメントパターンを示す図である。

図 8 3 は、本実施形態に係る質量分析システムの構成を示す図である。

図 8 4 は、マトリックス溶液を流路にスプレーする方法を示す図である。

図 8 5 は、試料の前処理方法を説明するための図である。

図 8 6 は、柱状体の構成の一例を示す図である。

5 図 8 7 は、アルミニウム層の周辺部が導電体層で覆われた状態を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施形態について説明する。以下の実施形態において、マイクロチップの全体構成は、図 3、図 21、図 22、図 23、図 35、図 37 または図 76 等の図に示された構成のいずれを採用してもよい。また、本明細書における実施形態中、「ピラー」は柱状体の一形態として示したものであり、円柱ないし橢円柱の形状を有する微小な柱状体をいう。また、「ピラーパッチ」および「パッチ領域」は、柱状体配設部の一形態として示したものであり、多数のピラーが群をなして形成された領域をいう。

#### (第一の実施形態)

図 1 は、本実施形態に係る質量分析システムの構成を示す図である。図 1 の質量分析システム 351 では、試料ステージ 355 上のマイクロチップ 353 に形成された流路（不図示）にレーザー発信器 361 からレーザー光が照射され、流路中に分離された試料がイオン化される。このとき、レーザー発信器 361 から発振されたレーザー光は、レーザー集光機構 359 によって集光され、マイクロチップ 353 上の流路に沿って照射される。このため、マイクロチップ 353 上の流路において予め試料を複数の成分に分離した後、分離方向に沿って流路にレーザー光を照射することにより、分離された各画分を順次イオン化することができる。イオン化されたフラグメントはイオン引出し電極 381 を通って質量分析部 363 にて検出される。

流路に沿ってレーザー光を照射する際には、マイクロチップ 353 を載置する試料ステージ 355 の位置を調節する駆動機構 357 によってマイク

ロチップ 353 上の流路の位置を移動させる。駆動機構 357 の動作は駆動機構制御部 367 によって制御される。駆動機構制御部 367 は、キーボード 379 から駆動方法を入力させてもよい。また、レーザー発信器 361 からのレーザー光照射はレーザー制御部 373 によって制御される。また、質量分析部 363 にて検出された信号は、分析結果解析部 371 にて解析される。

分析結果解析部 371 における解析結果は、駆動機構制御部 367 における位置情報、レーザー制御部 373 におけるレーザー光照射条件の情報と関連づけられて記憶部 369 に保存され、イメージ化部 375 にてイメージ化される。イメージ化された解析結果は、ディスプレイ 377 に表示される。

なお、駆動機構制御部 367、分析結果解析部 371、レーザー制御部 373、記憶部 369、およびイメージ化部 375 は質量分析システムを制御する制御部 365 に含まれる。

次に、質量分析システム 351 を用いた質量分析システムの手順について図 2 を用いて説明する。図 2 は、図 1 の質量分析システムを用いた質量分析方法を示す図である。まず、マイクロチップ 353 上の流路（不図示）で試料を画分に分離した後、試料ステージ 355 上の試料ホルダ（不図示）にマイクロチップ 353 をとりつけ（S11）、試料チャンバ（不図示）内を減圧し、真空にする（S12）。

駆動機構 357 により試料ステージ 355 の試料ホルダの位置を初期状態とし（S13）、マイクロチップ 353 上の流路（不図示）上にレーザー光が照射されるように位置決めをする（S14）。そして、レーザー発信器 361 のレーザー発振を開始し（S15）、マイクロチップ 353 の Z（高さ）方向の位置調整を行う（S16）。

次いで、マイクロチップ 353 上の流路（不図示）にレーザー光を照射し（S17）、質量分析を行い（S18）、分析結果解析部 371 で得られたスペクトルを記憶部 369 に記憶させる（S19）。そして、試料ステージ 355 を X 方向および Y 方向に順次微少量移動させ（S21、S22）、S1

7～S 1 9 の各ステップを終点まで繰り返す (S 2 0 の N O)。

レーザー照射を終点まで行ったら (S 2 0 の Y E S)、レーザー発信器 3  
6 1 を停止し (S 2 3)、得られた質量スペクトルをイメージ化部 3 7 5 に  
てイメージ化する (S 2 4)。そして、各成分についてのイメージに基づき、  
5 タンパク質の同定等を行う (S 2 5)。

なお、ステップ 1 8 の質量分析において、イオン化の方式はレーザー照射  
により行う方式であれば、L D (レーザー脱離イオン化) であっても、M A  
L D I (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) であってもよい。また、  
10 イオン化した試料の分離方式に特に制限はなく、T O F (飛行時間型)、そ  
の他所定の方法で分離することができる。さらに、ステップ 1 8 において、  
質量分析 (M S) にかえて、M S / M S としてもよい。M S / M S とすれば、  
より詳細な情報を得ることができる。

マトリックスとしては、シナピン酸、 $\alpha$ -C H C A ( $\alpha$ -シアノ-4-ヒ  
ドロキシ桂皮酸)、2, 5-D H B (2, 5-ジヒドロキシ安息香酸)、2,  
15 5-D H B およびD H B s (5-メトキシサリチル酸) の混合物、H A B A  
(2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ) 安息香酸)、3-H P A (3-ヒド  
ロキシピコリン酸)、ジスラノール、T H A P (2, 4, 6-トリヒドロキ  
シアセトフェノン)、I A A (トランス-3-インドールアクリル酸)、ピコ  
リン酸、ニコチン酸等を用いることができる。このうち、たとえば試料が未  
20 変性タンパク質である場合、マトリックスとして2-D H B を用い、赤外光  
レーザーを照射してイオン化することが好ましい。こうすれば、試料を確実  
にイオン化することが可能となり、測定精度が向上する。

マトリックスを用いる場合には、マトリックスとして用いる物質をたとえ  
ば所定のタイミングで流路に導入してもよいし、緩衝液等の移動相中に予め  
25 添加しておいてもよい。また、試料を分離した後に流路にマトリックス溶液  
をスプレー等により塗布してもよい。

図 8 4 (a) ~ 図 8 4 (c) は、マトリックス溶液を流路にスプレーする  
方法を示す図である。図 8 4 (a) では、金属板 3 8 3 上にマイクロチップ

353を設置し、噴霧器385からエレクトロスプレー法によりマトリックス溶液387を噴霧する。エレクトロスプレー法は、細い金属の管に高電圧をかけると、管中の液体が非常に細かい微粒子となって噴霧される現象を利用したスプレー方法である。

5 噴霧器385と金属板383との間に、たとえば500V～5kVの電圧を印加し、マイクロチップ353上の流路（図84（a）では不図示）から5mm～10cm程度離れた位置から噴霧を行うことにより、流路にマトリックス溶液387を噴霧することが可能となる。このときの噴霧量は、たとえば数 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度とすることができます。

10 図84（b）は、ネプライザーガスの圧力により噴霧器389からマトリックス溶液387を噴霧する方法である。ネプライザーガスとしては、たとえばN<sub>2</sub>やAr等の不活性ガスを用いることができる。

15 図84（c）は、エレクトロスプレー法とネプライザーガスの圧力を組み合わせて用いることができる噴霧器399を示す図である。図84（a）の場合と同様にして噴霧器399と金属板383との間に電圧を印加すればエレクトロスプレー法とすることができる、また、電圧を印加せずに、図84（b）の場合と同様にネプライザーガスの圧力によってマトリックス溶液387を噴霧することもできるよう構成されている。さらに、電圧とガスの圧力を同時に付与して噴霧することもできる。

20 また、マトリックスをシート状に成形し、流路を被覆してもよい。こうすれば、分離時の試料の乾燥が抑制される。かつ、分離後、流路上部のシートを除去する必要がない。さらに、シートを設けた状態でレーザー光を照射すれば試料とマトリックスとが混合されるため、分離後の試料にマトリックスを添加する操作が不要となる。

25 以下、図1の質量分析システム351に用いるマイクロチップ353の構成について説明する。質量分析システム351に用いるマイクロチップ353では、流路や試料分離領域をシリコン基板や石英等のガラス基板あるいはシリコン樹脂等の樹脂基板の表面に形成することができる。たとえば、基板

の表面に溝部を設け、これを表面部材によって封止し、これらによって囲まれた空間内に流路や試料分離領域を形成することができる。

分離領域には、複数の柱状体が設けられる。柱状体は、たとえば、基板を所定のパターン形状にエッチングすることにより形成することができるが、  
5 その作製方法は特に制限はない。

柱状体の形状は、円柱、楕円柱等、擬円柱形状；円錐、楕円錐、三角錐等の錐体；三角柱、四角柱等の角柱のほか、ストライプ状の突起等、様々な形状を含む。柱状体のサイズは、幅はたとえば10nm～1mm程度、高さはたとえば10nm～1mm程度とすることができる。

10 隣接する柱状体の間隔は、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮、

(ii) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固体物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮、

(iii) 液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮、  
15 といった処理において、

(i) の場合、1μm～1mm、

(ii) の場合、100nm～10μm、

(iii) の場合、1nm～1μm、

20 とすることができます。

また、試料分離領域中に一または二以上の柱状体配設部を設けることができる。柱状体配設部は柱状体群を含む。各柱状体配設部中の柱状体群は、互いに異なるサイズ、間隔で任意の配置とすることができます。また、柱状体を同一サイズとしてほぼ等間隔に規則正しく形成してもよい。

25 隣接する柱状体配設部間の間隔には、試料の通過し得るパスが形成される。ここで、柱状体配設部間の間隔を柱状体間の間隔よりも大きくすると、巨大サイズの分子等を円滑に移動させることができるので、分離効率を一層向上させることができる。

図3は、質量分析装置351の試料ステージ355にマイクロチップ353として設置されるマイクロチップ307の構成を示す図である。基板110上に分離用流路112が形成され、それぞれその両端に液溜め101aおよび液溜め101bが形成されている。分離用流路112には、複数の柱状体(不図示)が配設されており、試料が分離されるようになっている。液溜め101aおよび液溜め101bには電極(不図示)が設けられており、これを用いて分離用流路112の両端に電圧を印加することができる。マイクロチップ307の外形寸法は用途に応じて任意の値が選択されるが、たとえば、図示したように、縦5mm～5cm、横3mm～3cmの値とする。

ここで、電極が設けられた液溜めの構造について、液溜め101aを例に図4および図5を参照して説明する。図4は、図3における液溜め101a付近の拡大図である。また図5は、図4におけるA-A'方向の断面図である。図4および図5に示したように、分離用流路112および液溜め101aが設けられた基板110上には、緩衝液を注入できるようにするための開口部802が設けられた被覆801が配設される。被覆801は、液溜め101a、液溜め101bおよび分離用流路112を被覆しておらず、これらの上部は開放されている。また被覆801の上には、外部電源に接続することができるよう伝導路803が設けられる。さらに、電極板804を、液溜め101aの壁面と伝導路803とに沿うように配設させる。電極板804と伝導路803とは圧着され、電気的に接続される。液溜め101bについても同様の構造とすることができます。

図3に戻り、マイクロチップ307を用いて試料の分離を行う方法について説明する。まず、緩衝液等の液体を液溜め101aから分離用流路112に導入しておく。そして、試料を液溜め101aに注入する。そして、液溜め101aと液溜め101bの間に、試料が液溜め101bの方向へ流れるように電圧を印加する。これにより試料は分離用流路112を通過することになり、この間に、分子の大きさと荷電の強さ、および柱状体間の隙間のサイズに応じた速度で、分離用流路112を進んでゆく。その結果、試料中の

異なる分子群は、それぞれ異なる速度で移動するバンドに分離される。

次に、マイクロチップ 307 中の分離用流路 112 の構造について説明する。図 6 は、図 3 中の分離用流路 112 の構造を詳細に示したものである。なお、図 6 に示した構造は、図 6 以降の図においても適用することが可能である。図 6 中、基板 110 に幅 W、深さ D の溝部が形成され、この中に、直径  $\phi$ 、高さ d の円柱形状のピラー 125 が等間隔で規則正しく形成されている。ピラー 125 間の間隙を試料が透過する。隣接するピラー 125 間の平均間隔は p である。各寸法は、たとえば図 6 中に示された範囲とすることができる。

図 7 は、図 6 の分離用流路 112 の断面図である。基板 110 に形成された溝部によって形成される空間内に多数のピラー 125 が形成されている。ピラー 125 の間隙は、分離用流路 112 となる。

多数のピラー 125 が密集して形成された構造を試料分離手段として用いる場合、主として 2 つの分離方式が考えられる。一つは、図 8 に示す分離方式である。もう一つについては、第四の実施形態において図 25 を参照して説明する。図 8 の方式では、分子サイズが大きい程、ピラー 125 が障害となり、図中の分離領域の通過時間が長くなる。分子サイズの小さいものは、ピラー 125 間の間隙を比較的スムーズに通過し、分子サイズが大きいものに比べて短時間で分離領域を通過する。

ピラー 125 を用いることにより、試料中の複数の成分を確実に分離することができる。このため、マイクロチップ 307 を図 1 におけるマイクロチップ 353 として用いて試料を分離後、図 1 の質量分析システム 351 の試料ステージ 355 に設置し、分離用流路 112 に沿ってレーザー発信器 361 からレーザー光を照射することにより、分離されたそれぞれのバンドがイオン化される。また、分離操作を試料ステージ 355 上で行い、分離操作に連続して質量分析を行ってもよい。

以上のように、本実施形態では、目的とする成分の抽出、乾燥、および構造解析を一枚のマイクロチップ 307 上で行うことが可能となる。このよう

なマイクロチップ 307 および質量分析システム 35.1 は、たとえばプロテオーム解析等にも有用である。

なお、分離を行う際には分離用流路 112 上部に被覆（不図示）を設けてもよい。被覆を設けることにより、分離中の試料の乾燥を抑制することができる。<sup>5</sup> 被覆として用いる材料は、たとえば P D M S（ポリジメチルシロキサン）のフィルムとすることができます。P D M S フィルムは着脱が容易で密封性に優れるため、これを用いることにより、分離中の試料の乾燥を好適に抑制することができる。また、分離終了後に基板 110 から容易に剥がすことが可能となり、分離終了後速やかに試料を乾燥させ、質量分析を行うことができる。<sup>10</sup> また、前述のようにマトリックスをシート状に成形し、被覆としてもよい。

また、以上においては柱状体を一定間隔で配設した例を示したが、柱状体配設部内において柱状体を異なる間隔で配設することもできる。こうすることで、大、中、小等の複数の大きさの分子またはイオンをさらに効率的に分離することができる。<sup>15</sup> また、柱状体の配置に関し、試料の進行方向に対して互い違いに柱状体を配置する方法を採用することも有効である。こうすることにより、目詰まりを効果的に防止しつつ目的の成分を効率的に分離することができる。

さらに、分離用流路 112 の壁面にD N A やタンパク質などの分子が粘着することを防ぐために、流路壁をコーティングすることが好ましい。<sup>20</sup> こうすれば、マイクロチップ 307 が良好な分離能を発揮することができる。コーティング材料としては、たとえば、細胞膜を構成するリン脂質に類似した構造を有する物質等が挙げられる。このような物質としてはリピジュア（登録商標、日本油脂社製）などが例示される。リピジュア（登録商標）を用いる場合は、0.5 w t % となるようにT B E（トリスボレイト+EDTA）バッファーなどの緩衝液に溶解させ、この溶液を分離用流路 112 内に満たし、<sup>25</sup> 数分間放置することによって流路壁をコーティングすることができる。また、流路壁をフッ素系樹脂などの撥水性樹脂、あるいは牛血清アルブミンなどの

親水性物質によりコーティングすることによって、DNAなどの分子が流路壁に粘着することを防止することもできる。

マイクロチップ307は、内部に緩衝液を導入した状態で使用されることが好ましい。ここで、分離用流路112の壁面や被覆部などの流路表面がプラスチックなどの疎水性材料で構成されている場合、緩衝液を導入することは通常、容易ではない。緩衝液を円滑に導入する方法としては、たとえば図9に示す方法を採用することができる。図示した方法では、遠心管151のホルダ153中にチップ150を固定した状態で遠心分離を行うことにより緩衝液がチップ150に導入される。チップ150として、マイクロチップ307を適用することにより、マイクロチップ307の流路内に緩衝液を確実に導入することができる。

緩衝液をより一層確実に流路に導入する方法として、分離用流路112の表面にシリコン酸化膜等の親水性膜を形成することが有効である。親水性膜の形成により、特に外力を付与しなくとも緩衝液が円滑に導入される。この点については図17を用いて後述する(図17(d)の工程で形成されるシリコン熱酸化膜209)。

また、上述のように流路壁がコーティングされたマイクロチップ307を用いて質量分析を行う場合、コーティング物質がバックグラウンドとして検出されることがあるが、シリコン熱酸化膜を形成して流路表面を親水化すると、後述のように質量分析時のバックグラウンドを低下させることができ、より一層測定精度を向上させることが可能となる。

マイクロチップ307において、分離用流路112に設けられる柱状体は、その頂部の直径が底部の直径よりも小さい形状を有することが好ましい。すなわち、柱状体が錐体ないし擬錐体形状を有し、断面が末広がりになっていることが好ましい。特に柱状体表面にシリコン酸化膜等の親水性膜を形成する場合、このような形状とすることによる効果が顕著となる。たとえば、柱状体を熱酸化してその表面に熱酸化膜を設けようすると、柱状体の底部近傍で酸化が進み、柱状体の高さが減少してアスペクト比が低下することがあ

る。柱状体の形状を上記のようにすると、このような酸化によるアスペクト比の低下を効果的に防止することができる。

また、柱状体の形状として上述の形状を採用した上で、試料分離領域に設けられた柱状体を、隣接する柱状体の側面が、該柱状体の底部において互いに接する程度に近接して形成することが望ましい。こうすることによって、酸化によるアスペクト比の低下を一層効果的に防止することができる。図10は、このような構造を採用した柱状体の一例である。図10では、基板110表面に円錐状の柱状体が設けられ、その表面がシリコン酸化膜104により覆われている。柱状体は、隣接する柱状体の側面が、該柱状体の底部において互いに接する程度に近接して形成されている。

このような配置とすることにより、基板110を熱酸化して表面をシリコン酸化膜で覆った場合、柱状体底部のシリコン酸化膜104の膜厚が薄くなり、柱状体のアスペクト比を良好に維持できる。この理由は必ずしも明らかではないが、円錐状の柱状体の側面が互いに接した構造となっているため、柱状体の底部近傍で酸化が進行した際、圧縮応力が発生し、それ以上の酸化が進みにくくなることによるものと推察される。

以上、マイクロチップ307の分離用流路112に柱状体が形成された構成について説明したが、柱状体を有する分離用流路112にレーザー光を照射して試料をイオン化する場合、レーザー光として、たとえば200～400 nm程度の波長を有する紫外光レーザーまたは800～11000 nmの波長を有する赤外光レーザーを用いることが好ましい。これらのレーザー光を用いることにより、試料が300 kDa～400 kDaの巨大分子である場合にも、確実にイオン化することが可能となる。このときの照射条件は、たとえば、0.1～500 μJ/パルスの強度でパルス幅は1～500 nsとすることができる。また、スポット径は、紫外光レーザーの場合はたとえば50 μm以下とし、赤外光レーザーの場合は500 μm以下とすることができる。

次に、図10に示したナノ構造体の形成方法について図11および図12

を参照して説明する。まず図11(a)のように、基板110上にシリコン酸化膜105、レジスト膜107をこの順で成膜する。次いで電子線露光等によりレジスト膜107をパターニングして所定の開口部を有するパターンを形成する(図11(b))。

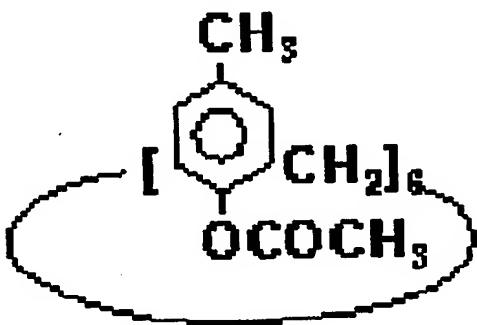
5 次いでこのレジスト膜107を用いてシリコン酸化膜105をドライエッチング等することにより、シリコン酸化膜105からなるハードマスクが形成される(図11(c))。レジスト膜107を除去した後(図11(d))、基板110をドライエッチングすることにより(図12(e))、アスペクト比の高い柱状体が得られる。シリコン酸化膜105を除去後(図12(f))、たとえば850°C以上の高温で表面を酸化し、シリコン酸化膜104を形成する(図12(g))。以上の工程により、図10に示すナノ構造体が得られる。このナノ構造体をマイクロチップ307の分離用流路112に形成し、試料の分離に用いることができる。

図11、図12においては、レジストマスクを用いて形成したハードマスクにより基板110をエッチングしたが、レジストマスクを用いて直接基板110をエッチングすることもできる。図13はこの方法を示す図である。図13に示したプロセスでは、基板110上にレジスト900を形成した後(図13(a))、パターニングし(図13(b))、これをマスクとして基板110をエッチングして柱状体を形成している(図13(c))。

20 次に、柱状体を有する流路を形成する別の方法について図14～図18を用いて説明する。図14～図18において、右側の図は上面図であり、左側の図は断面図である。まず、図14(a)に示すように、シリコン基板201上にシリコン酸化膜202、カリックスアレン電子ビームネガレジスト203をこの順で形成する。シリコン酸化膜202、カリックスアレン電子ビームネガレジスト203の膜厚は、それぞれ35nm、55nmとする。次に、電子ビーム(EB)を用い、試料の流路となるアレー領域を露光する。現像はキシレンを用いて行い、イソプロピルアルコールによりリヌスする。この工程により、図14(b)に示すように、パターニングされたレジスト

204が得られる。

なお、下記に示す構造を有するカリックスアレーン電子ビームネガレジスト203は、電子線露光用のレジストとして用いられ、ナノ加工用のレジストとして好適に利用することができる。



5

つづいて全面にポジフォトレジスト205を塗布する（図14（c））。膜厚は $1.8\ \mu\text{m}$ とする。その後、アレー領域が露光するようにマスク露光をし、現像を行う（図14（d））。

次に、シリコン酸化膜202を $\text{CF}_4$ 、 $\text{CHF}_3$ の混合ガスを用いてRIEエッチングする。エッチング後の膜厚を $35\ \text{nm}$ とする（図15（a））。レジスト204をアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後、酸化プラズマ処理をする（図15（b））。つづいて、シリコン基板201を $\text{HBr}$ ガスを用いてECRエッチングする。エッチング後のシリコン基板201の膜厚を $400\ \text{nm}$ とする（図15（c））。つづいて $\text{BF}_3$ バッファードフッ酸でウェットエッチングを行い、シリコン酸化膜202を除去する（図15（d））。

次に、シリコン基板201上にCVDシリコン酸化膜206を堆積する（図16（a））。膜厚は $100\ \text{nm}$ とする。つづいて全面にポジフォトレジスト207を塗布する（図16（b））。膜厚は $1.8\ \mu\text{m}$ とする。つづいて図16（c）のように、流路領域をマスク露光し（アレー領域を保護）、現像する。その後、CVDシリコン酸化膜206をバッファードフッ酸でウェットエッチングする（図16（d））。その後、有機洗浄によりポジフォトレ

ジスト 207 を除去し (図 17 (a))、TMAH (テトラメチルアンモニウムハイドロキサイド) を用いてシリコン基板 201 をウェットエッティングする (図 17 (b))。つづいて CVD シリコン酸化膜 206 をバッファードフッ酸でウェットエッティングして除去する (図 17 (c))。

5 そして、この状態のシリコン基板 201 を炉に入れてシリコン熱酸化膜 209 を形成する (図 17 (d))。このとき、シリコン熱酸化膜 209 の膜厚がたとえば 20 nm となるように熱処理条件を選択する。このような膜を形成することにより、流路の表面を親水化し、流路内に緩衝液を導入する際の困難を解消することができる。その後、流路上に被覆 210 を設けてもよい  
10 (図 18)。

以上により、柱状体を有する流路が得られる。基板 110 をシリコン基板 201 としてこの方法を用いることにより、微細な柱状体配列構造を精度よく確実に形成することが可能である。

さらに、柱状体を有する流路の別の作製方法として、マスクのパターニングを行う方法について説明する。図 19 は、分離用流路 112 の製造方法を示す工程断面図である。まず図 19 (a) に示すように、表面に樹脂膜 160 が形成されたシリコンからなる基板 110 と、成型面を所定の凹凸形状に加工した金型 106 とを用意する。樹脂膜 160 の材質はポリメチルメタクリレート系材料とし、その厚みは 200 nm 程度とする。金型 106 の材質は特に制限がないが、Si、SiO<sub>2</sub>、SiC 等を用いることができる。

次いで図 19 (b) に示すように、金型 106 の成型面を樹脂膜 160 表面に当接させた状態で加熱しながら加圧する。圧力は 600 ~ 1900 ps i 程度とし、温度は 140 ~ 180 °C 程度とする。その後、基板 110 を脱型し、酸素プラズマアッティングを行い、樹脂膜 160 をパターニングする (図 19 (c))。

つづいて樹脂膜 160 をマスクとして基板 110 をドライエッティングする (図 19 (d))。エッティングガスは、たとえばハロゲン系ガスを用いる。

エッティング深さは約 0.4 μm であり、エッティングにより形成される柱状体の間隔は約 100 nm である。エッティングのアスペクト比（縦横比）は 4 : 1 程度である。このとき、エッティングによって生じた凹部の底近傍では、マイクロローディング効果によりエッティングの進行が鈍化し、凹部の先端が狭まり、曲面となる。この結果、柱状体は末広がりになり、その断面形状は、頂部よりも底部において幅広となる。また、柱状体間の距離が狭いため、各柱状体は、隣接する柱状体の側面が、該柱状体の底部において互いに接する程度に近接して形成されることとなる。

図 19 (d) の後、800～900℃の炉アニールにより熱酸化を行い、  
柱状体の側壁にシリコン熱酸化膜（図 19 では不図示）を形成する。このとき、柱状体および凹部の形状が上述した末広がりの形状となっているため、図 10 を用いて前述したように、柱状体底部の酸化膜厚が薄くなり、柱状体のアスペクト比を良好に維持できる。

以上の工程により、基板 110 上に柱状体群が形成される。このようすれば、電子線露光によるマスク開口部の形成工程が不要となるため、生産性が顕著に向上する。

図 19においては、マスクとなる樹脂膜 160 のパターニングを行う際に金型を用いたが、この金型を用いて直接柱状体を形成することもできる。具体的には、所定のプラスチック材料を基板上にコートした後、上記と同様の工程により加工成型することができる。基板上にコートするプラスチック材料は、成型性が良好で、かつ、適度な親水性を有するものが好ましく用いられる。たとえば、ポリビニルアルコール系樹脂、特にエチレン-ビニルアルコール樹脂 (EVOH)、ポリエチレンテレフタレート等が好ましく用いられる。疎水性樹脂であっても、成型後、上記コーティングを行えば流路表面を親水性とすることができるので利用可能である。

なお、以上の流路形成方法において、シリコン熱酸化膜を形成する際に、酸化条件によっては膜が充分に形成されないこともあり得る。このような場合、電流が基板へ漏れてしまうことから、試料の分離を電気泳動により行う

際には必要な電界が得られることになる。これを回避するために、図 20 に示すようにして基板に分離用流路および液溜めを設けることができる。

まず、図 20 (a) に示すようにシリコン基板 201 を熱酸化することによりシリコン酸化膜 202 を形成する。その後、シリコン酸化膜 202 上に多結晶シリコンを堆積させ、多結晶シリコン膜 707 を形成する。つづいて多結晶シリコン膜 707 を熱酸化することにより酸化膜 708 を形成する。  
5

次に、酸化膜 708 上にカリックスアレン電子ビームネガレジストを形成し、電子ビーム (EB) を用い、液溜めおよび試料の流路となる領域をパターン露光することによりレジストをパターニングする。その後、酸化膜 7  
10 08 を RIE エッティングし、レジストを除去して図 20 (b) に示された状態とする。つづいて、エッティングされた酸化膜 708 を保護膜として多結晶シリコン膜 707 を ECR エッティングする。その後、酸化膜 708 を除去し、図 20 (c) に示された状態とする。その後、エッティングされた多結晶シリコン膜 707 を熱酸化し、シリコン酸化膜 202 と一体化させることにより  
15 図 20 (d) に示された状態とする。

以上のようにして加工された分離用流路は、シリコン基板 201 とは完全に絶縁されている。このため、基板 110 をシリコン基板 201 とすれば、電界を付与して試料を分離する際に、その電界を確実に確保することが可能である。また、シリコン基板 201 およびシリコン酸化膜 202 を石英基板  
20 で代替してもよい。また、シリコン基板 201、シリコン酸化膜 202 および多結晶シリコン膜 707 の代わりに SOI (Silicon On Insulator) 基板を利用することもできる。

さらに、図 86 は、柱状体の別の構成を示す図である。図 86 (a) では、基板 110 および柱状体が金属で構成されている。また、図 86 (b) では、  
25 柱状体の表面に金属膜 397 が形成されている。このように、少なくとも柱状体の表面が金属により構成されていれば、柱状体の表面に表面プラズモン波が発生し、分離された試料のイオン化を促進することができる。また、柱状体先端の突部に電界が集中し、イオン化した試料の引き出し効率が向上す

る。

図86(a)に示した構成は、たとえば金属製の基板110をエッチングすることによって形成することができる。また、図86(b)に示した構成は、たとえばシリコンの基板110について、図11および図12を用いて5前述した方法により図12(f)までの工程を行い、形成された柱状体の表面にたとえば銀等の金属を蒸着することにより形成することができる。

なお、本実施形態の質量分析システムについて、図3に示した構成の試料分離部112を有するマイクロチップを用いて試料としてヒトの血清を用いてこれを分離し、質量分析を行ったところ、質量分析結果より、試料中に10アルブミンが存在することが確かめられた。

#### (第二の実施形態)

図1の質量分析システムにおいて、マイクロチップ353は、交差する複数の流路を有する構成としてもよい。図21は、質量分析システム351に適用可能なマイクロチップ307の構成を示す図である。

図21でも、図3のマイクロチップ307と同様、基板110上に分離用15流路112が形成されている。そして、これと交差するように投入用流路111が形成されている。投入用流路111および分離用流路112には、それぞれその両端に液溜め101aおよび液溜め101b、液溜め102aおよび液溜め102bが形成されている。各々の液溜めには電極(不図示)が20設けられており、第一の実施形態に記載の方法と同様にして、たとえば分離用流路112の両端に電圧を印加することができる。マイクロチップ307の外形寸法は用途に応じて適宜な値が選択されるが、通常は、図示したように、縦5mm～5cm、横3mm～3cmの値とする。

図21のマイクロチップ307を用いて分離を行う場合、試料を液溜め125102aもしくは液溜め102bに注入する。液溜め102aに注入した場合は、液溜め102bの方向へ試料が流れるように電圧を印加し、液溜め102bに注入した場合は、液溜め102aの方向へ試料が流れるように電圧を印加する。これにより、試料は投入用流路111へと流入し、結果的に投入

用流路 111 の全体を満たす。この時、分離用流路 112 上では、試料は投入用流路 111 との交点にのみ存在し、投入用流路 111 の幅程度の狭いバンドを形成している。

次に、液溜め 102a、液溜め 102b の間への電圧印加を中止し、液溜め 101a と液溜め 101b の間に、試料が液溜め 101b の方向へ流れるように電圧を印加する。これにより試料は分離用流路 112 を通過することになり、この間に、分子の大きさと荷電の強さ、および柱状体間の隙間のサイズに応じた速度で、分離用流路 112 を進んでゆく。このように、図 21 のマイクロチップ 307においても、図 3 のマイクロチップ 307 と同様、分離用流路 112 の両端に電圧が印加され、これにより試料が分離用流路 112 中を移動する。

その結果、試料中の異なる分子群は、それぞれ異なる速度で移動するバンドに分離される。ここで、試料に外力を与えるための電圧以外に、電気浸透流を抑制するための電圧を印加してもよい。図 22 ではこの目的のため、基板にゼータ補正電圧を印加している。このようにすれば電気浸透流が抑制され、測定ピークのプロードニングを有効に防止することができる。

なお、図 21において、分離用流路 112 と投入用流路 111 とは直交しているが、これに限られない。たとえば分離用流路 112 と投入用流路 111 とが 45 度の角度で交わる構成を採用しても上記と同様の効果が得られる。

図 21 のマイクロチップ 307 を用いて試料を分離後、第一の実施形態と同様にして分離用流路 112 の延在方向に沿ってレーザー光を照射することにより、分離されたそれぞれのバンドがイオン化される。

### (第三の実施形態)

第一の実施形態および第二の実施形態に記載のマイクロチップ 307 では、電圧を印加することによって試料を移動させる方式を採用しているが、電圧に代え、圧力を加える方式を採用することもできる。図 23 はこのようなマイクロチップの一例である。図 23において、分離用チップの投入用流

路 19 と分離用流路 20 の端にある液溜め部分には、ジョイントメスが固着してある。それぞれのジョイントメスには、中空のチューブ 13、チューブ 14、チューブ 15、チューブ 16 がつながれた、ジョイントオスを接続する。このようなジョイント 17 を用いる理由は、液漏れを防ぐためである。

5 ジョイント 17 の具体的な構造は、たとえば図 24 のようにする。

ジョイントオスにつながれた各チューブは、それぞれ電磁弁 10、電磁弁 4、電磁弁 5、電磁弁 11 に接合されている。電磁弁 10 には、分離用ポンプ 8、定速注入装置 9 を介して、液溜め 7 から緩衝液が供給される。また、電磁弁 11 には、分離用流路 20 を介して送られてきた試料が供給され、廃液溜め 12 へと導かれる。電磁弁 4 には、投入用ポンプ 2、定速注入装置 3 を介して、サンプル溜め 1 から試料が供給される。電磁弁 5 には、投入用流路 19 を介して送られてきた試料が供給され、廃液溜め 6 へと導かれる。

10 制御ユニット 21 は、電磁弁 4、電磁弁 5、電磁弁 10、電磁弁 11、および分離用ポンプ 8、投入用ポンプ 2、定速注入装置 9、定速注入装置 3、の稼動時点を制御する。

この装置を用いた分離手順は以下のとおりである。まず、電磁弁 10 および電磁弁 11 を閉じる。これにより投入用流路 19 から試料が分離用流路 20 に流入することを防止できる。ついで電磁弁 4、電磁弁 5 を開く。そして、サンプル溜め 1 に試料を投入する。

20 次に投入用ポンプ 2 で試料を加圧し、試料を、定速注入装置 3、電磁弁 4、チューブ 14 を介して、投入用流路 19 へ導く。投入用流路 19 を介して漏出した試料は、チューブ 15、電磁弁 5 を通って、廃液溜め 6 に導かれる。

25 投入用流路 19 に試料が満たされた後、電磁弁 4、電磁弁 5 を閉じ、電磁弁 10 および電磁弁 11 を開く。つづいて、分離用ポンプ 8 で緩衝液を加圧し、定速注入装置 9、電磁弁 10、チューブ 13 を介して試料を分離用流路 20 へ導く。こうして分離操作が行われる。この構成では、試料を移動させるための外力として圧力を利用しているため、比較的簡素な外力付与装置を設ければ済むので、製造コストの低減、装置の小型化に有利である。

本実施形態のマイクロチップも、マイクロチップ 353 として図 1 に示した質量分析システム 351 に好適に適用することができる。

#### (第四の実施形態)

本実施形態は、図 1 の質量分析システム 351 に用いるマイクロチップ 353 の別の構成に関する。マイクロチップ 353において、分離用流路 112 を図 8 のように構成した場合、試料中に巨大なサイズの物質を含む際に目詰まりを起こすことがある。いったん発生した目詰まりを解消することは一般に困難である。

目詰まりの問題は、分子サイズの小さい物質を多種類含む試料を高い分離能で分離しようとしたとき、より顕著となる。分子サイズの小さい物質を多種類含む試料を高い分離能で分離するためには、ピラー 125 間の間隙をある程度小さく設定することが必要となる。ところが、そのようにすると、大きいサイズの分子にとっては、より目詰まりしやすい形態となる。

この点、図 25 に示す分離方式とすると、このような問題が解消される。

図 25 中、分離用流路 112 には、複数の柱状体配設部（ピラーパッチ 121）が離間して形成されている。各柱状体配設部には、それぞれ、同一サイズのピラー 125 が等間隔に配置されている。この分離用流路 112 では、大きな分子が小さな分子よりも先に通過していく。分子サイズが小さいほど、分離領域中でトラップされて長い経路を通ることになる一方、大きいサイズの物質は、隣接するピラーパッチ 121 間のパスを円滑に通過するからである。

この結果、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となるので、目詰まりの問題が低減され、スループットが顕著に改善される。こうした効果をより顕著にするためには、隣接するピラーパッチ 121 間のパスの幅を、ピラーパッチ 121 中のピラー 125 間の間隙よりも大きくするのが良い。パスの幅は、ピラー 125 間の間隙の好ましくは 2～20 倍程度、より好ましくは 5～10 倍程度とする。

複数の柱状体配設部を有する分離用流路 112 は、たとえば以下のようにして作製することができる。図 26 および図 27 は、本実施形態に係るマイクロチップの流路の作製工程を示す図である。基板 110 にこれらの図におけるシリコン基板 201 を適用する。

5 まず、図 26 (a) に示したように、シリコン基板 201 上に膜厚 35 nm のシリコン酸化膜 202 を形成する。次に、膜厚 55 nm のカリックスアレーン電子ビームネガレジストを形成し、電子ビーム (EB) を用い、試料の流路となるアレー領域を露光する。現像はキシレンを用いて行うことができる。また、リンスはイソプロピルアルコールにより行うことができる。この工程により、図 26 (b) に示すように、パターニングされたレジスト 204 が得られる。

10 次に、シリコン酸化膜 202 を  $\text{CF}_4$ 、 $\text{CHF}_3$  の混合ガスを用いて RIE エッティングする (図 26 (c))。そして、レジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後、酸化プラズマ処理し、シリコン基板 201 を  $\text{HBr}$  ガスおよび酸素ガスを用いて ECR エッティングする (図 27 (d))。その後、 $\text{BHF}$  バッファードフッ酸でウェットエッティングを行い、シリコン酸化膜 202 を除去する。こうして得られた基板を炉に入れてシリコン熱酸化膜 209 を形成する (図 27 (e))。以上により、複数の柱状体配設部を有する流路が得られる。

20 なお、本実施形態においても、第一の実施形態と同様、柱状体配設部内において柱状体を異なる間隔で配設することもできる。

たとえば、図 28 (a) のように、流れの向きにしたがってピラーの間隔を小さくした柱状体配設部を採用することができる。この場合、流路の下流側で柱状体の集積密度が高くなり、柱状体配設部に進入した分子は移動するほど移動速度が低下するため、柱状体配設部に進入することができない大きめの分子との保持時間差が顕著となる。その結果、分離能の向上が実現される。一方、図 28 (b) のように、流れの向きにしたがってピラーの間隔を大きくした柱状体配設部を採用することもできる。このようにすることによ

り、流路の下流側で柱状体の集積密度を低下させて柱状体配設部における詰まりを抑制することができるため、スループットの向上を図ることが可能となる。なお、流れの向きにしたがってピラーの間隔を小さくしたり、大きくしたりする形態は、柱状体配設部を有しない分離領域にも適用することができる。

さらに、複数の柱状体配設部をまとめてさらに大きな柱状体配設部とし、その大きな柱状体配設部同士の間隔を、もとの柱状体配設部同士の間隔よりも広くするような階層的な配置も可能である。その一例を図29に示す。小さなピラーパッチ712が七つ集合することにより中程度のピラーパッチ713を形成し、さらに中程度のピラーパッチ713が七つ集合することにより大きなピラーパッチ714を形成している。このように、柱状体配設部を階層的に構成することにより、幅広いサイズレンジの分子を同時にかつ大きい順に分離することが可能になる。すなわち、より大きな分子はより大きな柱状体配設部の間を通過するのに対して、中等度のサイズの分子は中等度のサイズの柱状体配設部の内部に捕捉されて分離される。さらに小さな分子は、さらに小さな柱状体配設部の内部に捕捉されて分離される。このため、小さな分子ほど流出に時間がかかり、大きさが異なる複数の分子を、大きい順に分離することが可能になる。

図25に示した分離方式を実現する試料分離領域の構造について、図30を参照して説明する。図30に示したように、この試料分離領域は、流路の壁129によって囲まれた空間内にピラーパッチ121が等間隔で配置された構造となっている。ピラーパッチ121は、それぞれ多数のピラーにより構成されている。ここでは、ピラーパッチ121の幅Rは、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下とする。一方、ピラーパッチ121間の間隔Qは $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下とする。

図25においては、ピラーが密集してなるピラーパッチ121は、上面からみて円形の領域として形成されているが、円形に限らず他の形状であってもよい。図31の例では上面からみてストライプ状の領域にパッチ領域130が形成されている。この形態においては、パッチ領域130の幅Rは $10$

$\mu\text{m}$ 以下、パッチ領域130間の間隔Qは $10 \sim 100 \mu\text{m}$ とする。

また、図32は菱形のピラーパッチ121を採用し、さらに複数のピラーパッチ121を菱形状になるように配置させた例である。この場合、バスと流れの向きとが一定の角度をなしており、分子とピラーパッチ121との接觸頻度が上昇するため、ピラーパッチ121を構成するピラーの間隔よりも小さい分子がピラーパッチ121に捕捉される確率は上昇する。そのため、ピラーパッチ121に捕捉された分子と捕捉されない大きめの分子との保持時間差が顕著となるため、分離能の向上を図ることができる。また、分離目的の分子の直径をRとした場合、ピラーパッチ121同士の間隔h、ピラーパッチ121の対角線Dおよびd、ピラーパッチを構成するピラーの間隔pについては次の条件を満たすことが好ましい。こうすることにより、目的とする分子を精度良く分離することができる。

$$h : R \leq h < 10R$$

$$p : 0.5R \leq p < 2R$$

$$15 \quad D : 5h \leq D < 20h$$

$$d : 5h \leq d < 20h$$

また、パッチ領域を構成するものはピラーに限られない。たとえば、板状体が一定の間隔で配置されてなるパッチ領域とすることもできる。図33に一例を示す。図33(a)は上面図であり、図中のA-A'断面図を図33(b)に示す。このパッチ領域を図33(c)に示すように配置する。一旦パッチ領域130に捕捉された分子は分離用流路112に脱出するまでパッチ領域130に留まることとなる。したがって、パッチ領域に捕捉された分子と捕捉されない分子との保持時間の差が顕著となるため分離能が向上する。また、分離目的の分子の直径をRとした場合、パッチ領域130同士の間隔Λ、パッチ領域130を構成する板状体同士の間隔入については次の条件を満たすことが好ましい。こうすることにより、目的とする分子を精度良く分離することができる。

$$\Lambda : R \leq \Lambda < 10R$$

$$\lambda : 0.5 R \leq \lambda < 2 R$$

また、上記の柱状体または板状体の頂部と流路の上面とは接していてよいし、離間していてよい。離間している場合は、柱状体あるいは板状体と流路上面との間に間隙が存在するため、大きな分子の通過機会が増加する。

このため、さらなる目詰まりの解消を図ることができる。また、小さな分子についても、この間隙を経由して上方からパッチ領域へ入り込む機会が増加することから、分離効果がさらに向上する。このような形態は、流路の上面となる部材（カバーガラスなど）にあらかじめ溝部を設けておくこと、または柱状体や板状体の高さを流路の深さよりも低く作製することによって容易に実現することが可能である。

また、柱状体配設部間のバスの幅及び、柱状体配設部内の柱状体の間隔は、分離しようとする成分、たとえば核酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質などの有機分子やキレートした金属イオンなどの分子またはイオンのサイズに合わせて適宜に選択される。たとえば柱状体の間隔は、分離したい分子群のサイズの中央値に相当する慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、上記中央値に相当する慣性半径と、柱状体の間隔との差異を、100 nm以内、より好ましくは10 nm以内、最も好ましくは1 nm以内とする。柱状体の間隔を適切に設定することにより、分離能が一層向上する。

隣接する柱状体配設部間の間隔（バスの幅）は、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と柱状体配設部間の間隔との差異を、当該分子の慣性半径の10%以内、より好ましくは5%以内、最も好ましくは1%以内とする。柱状体配設部間の間隔が広すぎると、サイズの小さい分子の分離が充分に行われなくなることがあり、柱状体配設部間の間隔が狭すぎると、目詰まりが発生しやすくなる場合がある。

（第五の実施形態）

図 1 のマイクロチップ 353 として用いるマイクロチップ、たとえば、図 21 に示したマイクロチップ 307において、分離用流路 112 に設けられた分離領域の上流すなわち試料が導入された側に、一列または複数列の柱状体を配設してもよい。この一例を図 34 に示す。図 34 (a) に示されるように、流路上に設けられた分離領域 711 の直前に一列のピラー列 710 が配設されている。このピラー列 710 における各々のピラーの間隔は、分離対象の分子群 709 に含まれる最小サイズの分子と同程度とすることが好ましい。このような構成を採用することにより、以下に説明する効果が得られる。なお、分離領域 711 は、上述したようなパッチ領域あるいは柱状体配設部を設けたものであってもよいし、柱状体が満遍なく配設されてなる分離領域であってもよい。

図 34 (a) において、弱い駆動力（たとえば微弱な電界）を分離対象の分子群 709 に付与すると、広範囲に拡散している分離対象の分子群 709 は流路を移動するが、ピラー列 710 に到達すると堰き止められるため、ピラー列 710 に隣接した帯状の狭い領域において細いバンドを形成する（図 34 (b)）。

次に、一時的に強い駆動力（たとえば強い電界）を分離対象の分子群に与えることによって、当該分子群は細いバンド状態を保つつピラー列を通過する（図 34 (c)）。これは、特に DNA やタンパク質のような高分子の場合、分子サイズがピラー同士の間隔よりも大きい場合であっても、ピラー列が一列ないし数列程度であれば当該分子は伸長することによりピラー間をすり抜けることができるによる（レプテーション効果）。

分離対象の分子群がピラー列を通過した後は、分離に適した駆動力を当該分子群に与えることにより効果的に分離することができる（図 34 (d)）。上記したように当該分子群は細いバンド状態を保っているため、分離後のピークの重なりが少なくなることから高精度の分離が実現するためである。

また、柱状体列を第四の実施形態の記載の構成に適用する場合、たとえば、図 28 (a) に示される柱状体配設部を有する分離領域の直前に、図 34 に

示されるピラー列 710 を設ける構成とすることもできる。

(第六の実施形態)

本実施形態は、図 1 の質量分析システム 351 に適用できるマイクロチップの別の構成に関する。本実施形態では、毛細管現象を利用して試料の分離を行う。図 35 は、本実施形態に係るマイクロチップの構成を示す図である。基板 550 に形成された分離用流路 540 には、分離用ピラー（不図示）が配置されている。基板 550 の材料および分離用ピラーの構成は、たとえば第一～第五の実施形態と同様にすることができる。分離用流路 540 の一端には空気穴 560 が設けられ、他端には分離時に緩衝液を注入するためのバッファー注入口 510 が設けられている。分離用流路 540 は、バッファー注入口 510、空気穴 560 以外の部分では密閉されている。分離用流路 540 の起始部には、サンプル定量管 530 がつながっており、サンプル定量管 530 の他方の端は、サンプル注入口 520 が設けられている。

サンプル定量管 530 には、定量用ピラー（不図示）が配置されている。定量用ピラーは、分離用ピラーよりも疎に配置されており、そこでサンプルの分離が起こることはない。サンプル定量管 530 のサンプル注入口 520 以外の部分は密閉されている。

図 36 は、図 35 に示したサンプル定量管 530 の近傍を拡大して示したものである。サンプル定量管 530 の内部の定量用ピラーとサンプル保持部 503 の間は、一時停止スリット 502 によって隔てられている。サンプル保持部 503 には、バッファー導入部 504、分離部 506 に設置されたピラーよりも、緻密なピラー（不図示）が設置されている。バッファー導入部 504 には、分離用ピラーと同程度に集積したのピラー（不図示）が設置されている。サンプル保持部 503、バッファー導入部 504 および分離部 506 は、一時停止スリット 505、および一時停止スリット 507 で隔てられている。サンプル保持部 503 の空隙体積は、サンプル定量管 530 の空隙体積と一時停止スリット 502 の体積の和にほぼ等しい。一時停止スリット 505 の幅は、一時停止スリット 502 の幅よりも狭い。

次に、図35の装置を用いた分離操作の手順について説明する。まず、サンプル注入口520にサンプルを徐々に注入しサンプル定量管530を満たす。この時、水面が盛り上がらないようとする。このサンプル注入操作において、サンプルは、図36に示されるサンプル定量管530に設置されたサンプル定量用ピラー間に保持される。サンプル定量管530がサンプルで満たされた後、サンプルは一時停止スリット502に徐々にしみ出してゆく。一時停止スリット502にしみだしたサンプルが、サンプル保持部503の表面に到達すると、一時停止スリット502およびサンプル定量管530の内部のサンプルは、さらに毛細管効果の大きい、サンプル保持部503へとすべて吸い取られる。サンプル定量管530よりもサンプル保持部503の方がより大きい毛細管効果を有する理由は、サンプル保持部503の方が、ピラーが密に形成され、表面積が大きいことによる。サンプル保持部503へのサンプル充填の間は、一時停止スリット505、507が存在するため、サンプルがバッファー導入部504あるいは分離部506に流れ込むことは無い。

サンプル保持部503にサンプルが導入された後、バッファー注入口510に分離用の緩衝液を注入する。注入された緩衝液は、バッファー導入部504に一時的に充填されて、サンプル保持部503との界面が直線状になる。さらに緩衝液が充填されると、一時停止スリット505にしみだして、サンプル保持部503に流入し、さらに、サンプルをひきずりながら、一時停止スリット507を超えて、分離部506へと進行する。この際、一時停止スリット502の幅が、一時停止スリット505、507の幅よりも大きいため、一時停止スリット502へ緩衝液が逆流しても、サンプルは既に、サンプル保持部503より先に進行しているため、サンプルの逆流はほとんどない。

分離用の緩衝液は毛細管現象で、分離部506を空気穴560へ向けてさらに進行し、この過程で、サンプルが分離される。

また、毛細管現象を用いたサンプルの定量注入の原理を利用した試料注入

の他の例について図37および図38を参照して説明する。この装置では、図36におけるサンプル定量管530に代えて、サンプル投入管570が設けられている。サンプル投入管570の両端には、サンプル注入口520と、排出口580が設けられている。サンプル投入管570の内部には、ピラーは設置されていない。サンプル投入管570は、投入穴509を介して、サンプル保持部503に開口している。

この装置を用いた分離手順について説明する。まず、サンプルを、サンプル注入口520に投入し、排出口580まで満たす。この間に、サンプルは、投入穴509を介してサンプル保持部503に吸収される。

そして、サンプル注入口520に空気を圧入して、サンプルを排出口580から排出することによりサンプル投入管570の内部のサンプルを払拭、乾燥する。毛細管現象による分離の場合は、上述のようにして分離用の緩衝液を注入する。電気泳動による分離の場合は、サンプルの投入以前に、バッファー注入口510に相当する液溜め、空気穴560に相当する液溜めから泳動用の緩衝液を導入しておく。広く作られた一時停止スリット505、507が存在するため、サンプル保持部503には、緩衝液が流入しない。

サンプル保持部503へのサンプルの保持が終わった段階で、さらに微量の泳動用の緩衝液を分離用流路の一端の液溜めに加えるか、サンプル保持部503の周辺に軽く振動を与えることで、泳動用の緩衝液を連続させ、電圧を印加して分離する。

以上のように、本実施形態のマイクロチップにおいては、毛細管現象によって試料を分離することが可能となる。このため、基板に電極を形成する必要がなく、装置構成をより単純にすることができる。

#### (第七の実施形態)

本実施形態は、図1の質量分析システム351に適用できるマイクロチップの別の構成に関する。本実施形態では、スリットを介して複数に分割された分離領域を流路に設けたマイクロチップを用いて分離を行う。図39は、本実施形態に係るマイクロチップの流路の構成を示す図である。図39にお

いては、流路中に、試料分離領域 601 が流路を塞ぐように形成されている。この試料分離領域 601 は、スリット 602 を介して複数に分割されている。壁 603 と試料分離領域 601 の間には間隙は存在しない。このような構成を採用した場合、分離された試料のバンドの形状が好適になり、分離能が向上する。<sup>5</sup> この点について図 40 を参照して説明する。

スリットがなく単一の試料分離領域 601 を設けた場合は、図 40 の左図中、上部から下部に流動する試料の液面は、曲面となる。これは、壁に沿った部分では毛細管現象により試料の移動が促進される一方、流路断面中央部では毛細管現象の効果が少ないとによる。壁近傍では試料の流動が速められる結果、図示したようなバンドが形状される。これに対して、試料分離領域 601 を、スリット 602 を介して複数に分割した場合、スリットの存在により、分離中の液はいったんスリット上部の試料分離領域に保持されることとなる。スリット中には空気が存在しているため、スリット上部の試料分離領域に存在する試料の圧力がスリット中の空気に由来する圧力を超えた<sup>10</sup>とき、はじめて試料分離領域からスリットへの液の移動が開始する。<sup>15</sup>

このように、試料を含む液がいったん試料分離領域に保持されるため、壁部および中央部で移動距離の差が生じても、保持される時間中にその差が解消されることとなる。この結果、スリットを抜けた段階では、液面は分離方向にほぼ垂直な平面となる（図 40 の右図）。これにより、分離方向に垂直なバンドが形成され、分離能が向上する。なお、試料分離領域 601 は、第一の実施形態～第四の実施形態に記載の任意の構成を採用することができる。たとえば上述したようなパッチ領域あるいは柱状体配設部を設けたものであってもよいし、柱状体が満遍なく配設されてなる試料分離領域であってもよい。<sup>20</sup>

<sup>25</sup> 図 41 および図 42 は、上記した毛細管現象による試料のバンド形状の相違を示す図である。図 41 のように、試料分離領域として従来用いられてきた单一人工ゲルを設けた場合はバンド形状が試料進行方向に対して曲がった形状となる。これに対して、図 42 では、ピラーが疎に形成された領域と

密に形成された領域を交互に形成した構成を採用している。ピラーが疎に形成された領域は、図39および図40におけるスリットと同様の役割を果たす。すなわち、ピラーが疎に形成された領域の手前で試料を含む液がいったん停止し、この間にピラーが密に形成された領域において生じた液の移動距離の差が解消され、この結果、試料進行方向に対してほぼ平面のバンド形状が得られる。

以上、毛細管現象を利用して試料を導入する場合におけるスリットおよびピラーが疎に形成された領域についての効果を説明したが、試料の移動に電界を利用した場合も、スリット等を配設することにより上記と同様の効果を得ることができる。電気泳動などによる分離の場合でも、泳動するに従ってバンドは曲がった形状となることが知られているが、このバンドの形状をスリット等によって整えることができる。なおこの場合、スリットが緩衝液で満たされていても、バンド形状を整える効果を得ることができる。

#### (第八の実施形態)

以上の実施形態においては、底面から流路中に突出する突起が形成された分離用流路112を用いて試料の分離を行う態様について説明したが、突起に代わり流路に凹部が形成された分離用流路112を用いても、試料の分離が可能である。

以下、凹部が形成された分離用流路112を有するマイクロチップについて説明する。凹部が形成された分離用流路112を有するマイクロチップも、図1の質量分析システム351に適用することができる。マイクロチップの基本的な構成は上述の実施形態と同様にすることができるため、以下、構成が異なる点を中心に説明をする。

凹部は、円柱、楕円柱、円錐、楕円錐のものが好適に用いられるが、直方体、三角錐等、さまざまな形状を採用することができる。また、凹部のサイズは、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固体物（細胞膜の断片、ミト

コンドリア、小胞体) と液状分画(細胞質) の分離、濃縮

(i i i) 液状分画の成分のうち、高分子量成分(DNA、RNA、タンパク質、糖鎖) と低分子量成分(ステロイド、ブドウ糖等) の分離、濃縮といった処理において、

5 (i) の場合、 $1 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ 、  
(ii) の場合、 $100 \text{nm} \sim 10 \mu\text{m}$ 、  
(iii) の場合、 $1 \text{nm} \sim 1 \mu\text{m}$ 、

とすることができる。

凹部の深さについても用途に応じて適宜設定することができるが、たとえば $5 \sim 2000 \text{nm}$ とすることができる。また、隣接する凹部の平均間隔は、好ましくは $200 \text{nm}$ 以下、より好ましくは $100 \text{nm}$ 以下、さらに好ましくは $70 \text{nm}$ とする。下限については特にないが、たとえば $5 \text{nm}$ 以上とすることができる。なお、凹部の間隔とは、凹部の中心点間距離をいう。

図43は、本実施形態に係るマイクロチップの分離用流路112の構造を詳細に示したものである。図43中、基板110に幅W、深さDの溝部が形成され、この溝の底部に、直径 $\phi$ 、深さdの円柱形状の穴が等間隔pで規則正しく形成されている。なお、流路の幅W、流路の深さD、穴の直径 $\phi$ 、穴の深さd、穴の間隔pについては、たとえば図示されたサイズとすることができます。また、後述の図46、図47、図48、図49、および図52に示される形態においても、W、D、 $\phi$ 、d、pについて同様のサイズとすることができます。

この流路は、分離の際には図44に示したように被覆部により覆われてもよい。このとき、基板に形成された流路が被覆部によって封止されて空間を形成しており、この空間内を試料が移動する。この被覆部は、試料に含まれる水分の蒸発を防止する役割を有する。また、図56を用いて後述する一実施形態においては、電極を流路上方に配設させることが必要であるため、試料の分離時に構成要素の一部として透明電極を有する被覆部が必須となる。

次に、多数の穴が設けられた構造が試料分離手段として機能する理由について、図45を参照して説明する。図45中、試料分離領域には、複数の穴部が所定の間隔で形成されている。この領域を通過する際、穴の径よりも大きなサイズの分子は、穴にトラップされることなく流路を素通りするため、5 短い時間でこの領域を通過する。一方小さいサイズの分子は、基板に設けられた穴にトラップされて長い経路を通ることになる。この結果、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で試料が分離される。

10 このように、分離用流路112に凹部が形成された構成では、目詰まりの原因となりやすいサイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となるので、目詰まりの問題が低減され、スループットが顕著に改善される。

15 図45に示した分離方式を実現する試料分離領域の構造の例について、図46を参照して説明する。図46に示したように、この試料分離領域は、開口部最大径 $\phi$ の凹部が間隔 $p$ にて規則的に形成されている。

図47は他の試料分離領域の例である。この例では凹部が列をなして整然と配列されている。

図48は他の試料分離領域の例である。この例では流路を進むにしたがつてサイズの大きな凹部が配列された構成となっている。

20 図49は他の試料分離領域の例である。この例では開口径の異なる凹部がランダムに配列された構成となっている。

図50は他の試料分離領域の例である。この例では凹部がストライプ状に形成されている。すなわち、凹部はホールではなく、溝となっている。この場合、 $\phi$ 、 $p$ はそれぞれ溝の幅、溝と溝との間隔を表している。

25 図51は他の試料分離領域の例である。この例では、流路を進むにしたがって幅が広くなる溝が流路中に設けられた構成となっている。

図52は他の試料分離領域の例である。図50と同様、凹部がストライプ状に形成されているが、試料の流れ方向に対するストライプの方向が、図5

0では平行であったのに対し、図52では垂直の関係となっている。この場合においても、 $\phi$ 、 $p$ はそれぞれ溝の幅、溝と溝との間隔を表している。

試料分離領域を、図48、図49、図51に示すような構成とすることにより下記のような効果が得られる。

5 穴や溝のサイズよりも大きな分子には、穴による分離効果が得られ難い。従って、穴や溝のサイズを一定にすると、その穴や溝のサイズよりも大きなサイズの分子に対する分解能は小さい分子に比べて低下してしまう。また、穴や溝のサイズを一定にすると、大きな分離効果が得られる分子サイズのレンジが狭くなってしまう。そのため、流路を図48、図49、図51に示す10 ような構造とすることにより、大きなサイズの分子に対する分解能を高くすることができるとともに、充分な分離効果が得られる分子サイズのレンジを広くすることができる。

15 凹部の開口部の最大径は、分離しようとする成分のサイズに合わせて適宜に選択される。たとえば、分離したい分子群のサイズの中央値に相当する慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとしてもよい。具体的には、上記中央値に相当する慣性半径と、凹部の開口部の最大径との差異を、100nm以内、より好ましくは10nm以内、最も好ましくは1nm以内とする。凹部の開口部の最大径を適切に設定することにより、分離能が一層向上する。

20 また、以上の構成では、凹部を一定間隔で配設した例を示したが、試料分離領域内において凹部を異なる間隔で配設することもできる。こうすることで大・中・小等の複数の大きさの分子・イオンを効率的に分離することができる。また、凹部の配置に関し、図46に示されるように、試料の進行方向に対して互い違いに凹部を配置する方法を採用することも有効である。こうすることにより、凹部と分子との遭遇機会が増すため、目詰まりを効果的に防止しつつ目的の成分を効率的に分離することができる。

25 また、以上の構成では、凹部が円柱状である例を示したが、凹部の形状はこれに限られない。たとえば、凹部の内径が底面に近づくに従って小さくな

っているテーパー状の形態を採用することもできる。具体的には、たとえば図53(a)に示されるように、凹部の内径が段階的に小さくなっている形態や、図53(b)または(c)に示されるような、凹部の内径が連続的に小さくなっている形態が挙げられる。これらの場合、小さい分子ほど凹部の奥深くまで移動可能であるため、当該凹部に滞在する時間が長くなる。その結果、分離能がさらに向上する。

このようなテーパー状の凹部は種々の手法により設けることができる。例えば上記した陽極酸化法により凹部を設ける際に、電圧を徐々に降下させることにより、テーパー状の凹部を設けることができる。

また、エッチングによりテーパー状の凹部を設けることも可能である。例えば基板としてシリコンを用いる場合、まず、設けようとする凹部の底面の内径と同程度の内径を有する縦穴をドライエッチングにより設ける。次に、この縦穴に対して等方性のエッチング液を用いたウェットエッチングを行う。このとき、縦穴におけるエッチング液の交換速度は、縦穴の底面において最も小さく、縦穴の底面から開口部へ向かうにつれて大きくなる。このため、縦穴の底面付近ではサイドエッチングがほとんど生じず、内径はほとんど広がらない。その一方で、底面から開口部へ近づくにつれてサイドエッチングの程度が大きくなることから、それに伴って内径も広がることになる。こうしてテーパー状の凹部を設けることができる。

さらに、以上の構成においては、凹部を平面上に配置させた例を示したが、凹部を立体的に配置させることも可能である。例えば、流路に分離板を設けることにより流路を二層に分割し、分離板および流路壁に凹部を設けることができる。

本実施形態の構成では、小さい分子ほど流出が遅くなるという特性を有している。大きな分子と同様の迅速さで小さい分子を分取するために、上記の分離板に目的の分子のサイズと同程度の口径の貫通孔を設けることができる。このようにすれば、目的とする小さい分子は、凹部の設けられた流路を迂回することができる。そのため、大きな分子と同様の迅速さで小さな分子

を分取することができるとともに、それ以外の分子の分離を実現することが可能となる。

図 5 4 は流路を二層に分割した形態の一例を示す図である。図 5 4 (a) は、流れ方向に対する垂直断面図である。シリコン基板 4 1 7 に設けられた流路 4 0 9 が分離板 4 1 9 により二層に分割されている。図 5 4 (b) は、図 5 4 (a) 中の A-A' 面における断面図である。分離板 4 1 9 には部分的に貫通孔 4 2 0 および凹部 4 2 1 が設けられており、貫通孔 4 2 0 を通過可能な分子は図中の下方の流路 4 0 9 に移動する。このような構造を採用することにより、流路が一層である構造では流出時間が遅い、小さな分子を迅速に分取することが可能となる。さらに分離板 4 1 9 に、凹部 4 2 1 よりも小さな凹部 4 2 2 を設けることもできる(図 5 4 (c))。このようにすることにより、下方の流路 4 0 9 において小さな分子の精密な分離を実現できる。

また、図 5 5 (a) または図 5 5 (b) のように、流路にピラーや突起を設け、そのピラーまたは突起および流路壁に凹部を設けることもできる。このようにすることにより、凹部を備えた分離領域の面積を増大させることができため、分離能の向上を図ることができる。

なお、本実施形態においても、第一の実施形態と同様、図 9 を用いて説明した方法で流路の内部に確実に緩衝液を導入することができる。また、試料を移動させる際に、図 2 2 を用いて説明した方法で電圧を印加してもよい。また、試料に外力を付与する手段は電圧に限られない。たとえば、流路に緩衝液を導入しない状態で、分離対象試料を含んだ緩衝液を導入する場合、この緩衝液が毛細管現象により自動的に流路に流入する。この過程で分離を実現することも可能である。

また、試料を分離するのみならず分取を実現する場合には、比較的多くの量の試料を導入する必要があるため、流路の深さを深く設定する。このような場合、分離対象の分子と凹部との接触する頻度が小さいため、充分な分離効果が期待できないことがある。そこで、こうした場合には流路の上面と底面との間に電圧を印加することにより分子を積極的に凹部へ導くことが好

ましい。

図56はこのような実施形態の一例である。ガラス基板436上に金電極437が配され、さらに金電極437上にポーラスアルミナ層438が設けられている。一方、流路442の上方に設けられた被覆部441はカバーガラス440とその下に配された透明電極439とから構成されている。ここで、金電極437を正極、透明電極439を負極として電圧を印加すると、分離対象分子は、透明電極439から金電極437へ向かう方向の外力を受けつつ流路を移動することになる。これにより、当該分子と凹部との接触頻度を上昇させることができるために、分離能の向上が実現する。電圧については、上記では直流電圧を用いた例を示したが、直流電圧および交流電圧ともに適用可能である。

直流電圧を採用する場合には、一般にDNAやタンパク質などの生体分子はマイナスに帯電しているため、凹部が備えられている側を正極に設定して電圧を印加する。また、過大な電圧を印加すると、分離対象の分子が凹部から脱出しづらくなるため流出が極めて遅くなってしまう。このため、印加する電界強度を50V/cm以下とすることが好ましい。

次に、基板への凹部の形成方法について説明する。凹部は、基板にエッチングを施すことによって作製することができる。図57は、基板への凹部の作製工程を説明するための図である。

まず、図57(a)に示すように、シリコン基板201を用意し、その上にカリックスアレーン電子ビームネガレジスト203を塗布する(図57(b))。次に、電子ビーム(EB)を用い、試料の流路となる部分を露光する。現像はキシレンを用いて行い、イソプロピルアルコールによりリノスする。この工程により、図57(c)に示すように、パターニングされたレジスト204が得られる。

つづいて、これをマスクとして、シリコン基板201をエッチングする(図57(d))。レジストを除去した後(図57(e))、再度全面にポジ型フォトレジスト205を塗布する(図57(f))。その後、流路部分が露光する

ようにマスク露光をし、現像を行う（図57（g））。ポジ型フォトレジスト205は、シリコン基板201に所望の凹部（穴部）が形成されるようにパターニングされている。

次に、シリコン基板201をCF<sub>4</sub>、CHF<sub>3</sub>の混合ガスを用いてRIEエッチングする（図57（h））。レジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後（図57（i））、必要に応じて被覆210を設け、凹部を完成する（図57（j））。

また、凹部は陽極酸化法によっても形成することができる。陽極酸化法とは、電解液中で酸化させたい金属（例えばアルミニウム、チタン、ジルコニウム、ニオブ、ハフニウム、タンタルなど）を陽極として通電し、酸化させる処理のことをいう。この処理法においては、酸性電解液を用い、通電による水の電気分解により、陰極では水素が生成するが、陽極では酸素が生成せず、金属表面に酸化被膜層が形成される。アルミニウムの場合、この酸化被膜層はポーラスアルミナと呼ばれ、図58に示されるように、ポーラスアルミナ層416は各セル431の中央に細孔430を持った周期的構造を有する。これらの構造は自己組織的に形成されるため、パターニングを必要とせず、容易にナノ構造を得ることができる。セルの間隔は酸化電圧に比例（2.5 nm/V）し、アルミニウムの場合では酸化電圧に応じて硫酸（～30V）、シュウ酸（～50V）、リン酸（～200V）が酸性電解液として使用される。

一方、細孔のサイズは酸化条件および酸化後の表面処理に依存する。酸化電圧の上昇に従って細孔の直径は拡大する。例えば、酸化電圧を5V、25V、80V、120Vとしたとき、それぞれ10nm、20nm、100nm、150nm程度の最大径を有する、開口部が円形ないし橢円形の細孔ができる。また、ポーラスアルミナを形成後、例えば3wt%のリン酸によりその表面をエッティングする表面処理が行われるが、この表面処理の時間が長いほど、細孔の直径は拡大することになる。

以上のように、酸化電圧や表面処理の時間を適宜選択することにより、規

則正しく整列し、かつ所望の間隔および直径を有する凹部を設けることが可能となる。

なお、ポーラスアルミナをより均質に設けるためには、図59または図87に示したように、陽極酸化する対象のアルミニウム層の周辺部を絶縁膜で覆いつつ、上記の陽極酸化を実施することが好ましい。たとえば図59は、絶縁性基板の上に形成されたアルミニウム層402の周辺部が絶縁膜411で覆われた状態を示す上面図である。絶縁膜411としては、たとえば感光性ポリイミドなどの絶縁性の樹脂を用いることができる。このようにすることにより、電極取付部412の周辺でのみ陽極酸化反応が速く進み、陽極から遠い部分では酸化されない領域ができる現象を抑制することができるため、アルミニウム層402全体にポーラスアルミナを均質に設けることが可能となる。

また、阿相らの方法 (J. Vac. Sci. Technol., B, 19(2), 569 (2001)) により、ポーラスアルミナを設けたい箇所に、モールドを用いて予め窪みを設けてから陽極酸化を実施することにより、ポーラスアルミナを所望の配置に設けることもできる。この場合も上記同様、電圧を制御することにより凹部の最大径を望みのものとすることができる。

また、図87は、アルミニウム層402の周辺部が導電体層413で覆われた状態を示す図である。図87(a)が上面図、図87(b)が断面図である。図87(a)、図87(b)に示したように、陽極酸化されない導電体(金など)をスライドガラス401上に設けられたアルミニウム層402に蒸着させることにより導電体層413を形成後、陽極酸化を実施することによってもアルミニウム層402全体にポーラスアルミナを均質に設けることが可能となる。なお、陽極酸化実施後、導電体層413は導電体が金の場合、金エッチャントにより取り除かれる。金エッチャントはヨウ化カリウムとヨウ素の水溶液を混合することによって得られる。混合比はヨウ化カリウム：ヨウ素：水 = 1 : 1 : 3 (重量比) とする。

さらに、本実施形態の構成においても、流路壁に対してDNAやタンパク

質などの分子が粘着することを防ぐために、流路壁をコーティングするなど、親水化処理をすることが好ましい。この結果、良好な分離能を発揮することができる。コーティング材料としては、例えば、細胞膜を構成するリン脂質に類似した構造を有する物質が挙げられる。このような物質としてはリピジ  
5 ュア（登録商標、日本油脂社製）などが例示される。リピジュア（登録商標）を用いる場合は、0.5 wt %となるようにTBEバッファーなどの緩衝液に溶解させ、この溶液を流路内に満たし、数分間放置することによって流路壁をコーティングすることができる。

また、流路壁をフッ素系樹脂などの撥水性樹脂または牛血清アルブミンなどの親水性物質によりコーティングすることによって、DNAなどの分子が流路壁に粘着することを防止することもできる。  
10

#### （第九の実施形態）

図1の質量分析システム351に用いるマイクロチップは、流路の表面に親水性と疎水性領域が形成されていてよい。たとえば、図3、図21、図  
15 22、図23、図35、または図37等の構成のマイクロチップに設けられた分離用流路112または分離用流路540中に、親水性と疎水性領域が形成された試料分離領域を設けてよい。この試料分離領域の表面は、2次元的に略等間隔で配置された複数の疎水性領域と、疎水性領域を除く試料分離部表面を占める親水性領域とからなっている。図60は、図3、図21、図  
20 22、図35、または図37中の分離用流路112または分離用流路540の構造を詳細に示したものである。図60中、基板701に深さDの溝部が形成され、この溝部に、直径 $\phi$ の疎水性領域705が等間隔で規則正しく形成されている。本実施形態において疎水性領域705は、疎水基を有するカップリング剤を基板701表面に付着ないし結合することにより形成している。図60には示していないが、分離の際には流路の上部には被覆を設けてよい。これにより溶媒の蒸発が抑えられる。また、圧力により流路中の試料を移動させることが可能となる。ただし、被覆を設けない構造とすることも可能である。被覆を設けない構造とすれば、質量分析を行う前に被覆

を除去する操作が必要なくなり、操作性が向上する。

図60中、各部の寸法は、たとえば以下のようにする。

W : 10 ~ 20  $\mu\text{m}$

D : 50 nm ~ 10  $\mu\text{m}$

5 Φ : 10 ~ 1000 nm

p : 50 nm ~ 10  $\mu\text{m}$

各部のサイズは、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、pについては、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

10 (ii) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固体物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(iii) 液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

といった処理において、

15 (i) の場合、1  $\mu\text{m}$  ~ 1 mm、

(ii) の場合、100 nm ~ 10  $\mu\text{m}$ 、

(iii) の場合、1 nm ~ 1  $\mu\text{m}$ 、

とする。

また、深さDの大きさは、分離性能を支配する重要な因子であり、分離対象となる試料の慣性半径の1~10倍程度とすることが好ましく、1~5倍程度とすることがより好ましい。

図61は、図60の構造の上面図（図61(a)）および側面図（図61(b)）である。疎水性領域705は、通常、0.1 ~ 100 nm程度の膜厚となる。疎水性領域705以外の部分は基板701の表面が露出した状態となっている。基板701としてガラス基板のように親水性材料を選択することにより、図60の構造において、親水性表面上に疎水性表面が所定のパターンをもって形成された構成となり、試料分離機能が発現する。すなわち、キャリア溶媒として親水性の緩衝液等を用いると、試料は親水性表面上のみ

を通過し、疎水性表面上は通過しない。このため、疎水性領域 705 が試料通過の障害物として機能し、試料分離機能が発現するのである。

次に疎水性領域 705 のパターン形成による分離方式について、分子サイズに着目して説明する。分離方式として主として 2 つ的方式が考えられる。

5 一つは、図 62 に示す分離方式である。この方式では、図 8 に示した場合と同様に、分子サイズが大きい程、疎水性領域 705 が障害となり、図示した分離部を通過するのに要する時間が長くなる。分子サイズの小さいものは、疎水性領域 705 間の間隙を比較的スムーズに通過し、分子サイズが大きいものに比べて短時間で分離部を通過する。

10 図 63 は、図 62 とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出する方式となっている。図 62 の方式では、図 25 に示した場合と同様に、試料中に巨大なサイズの物質を含む場合、このような物質が疎水性領域 705 の間隔を塞いでしまい、分離効率が低下する場合がある。図 63 に示す分離方式では、このような問題が解消される。図 63 中、分離用流路 112 中に複数の試料分離部 706 が離間して形成されている。各試料分離部 706 内には、それぞれ、略同一サイズの疎水性領域 705 が等間隔に配置されている。

15 試料分離部 706 間には、大きな分子が通り抜けられるような広幅のパスが設けられているため、図 62 とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出するようになる。分子サイズが小さいほど、分離領域中でトラップされて長い経路をすることになる一方、大きいサイズの物質は、隣接試料分離部 706 間のパスを円滑に通過するからである。この結果、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。20 サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となるので、前述した疎水性領域 705 間に大きな分子がトラップされて分離効率が低下するといった問題が低減され、分離効率が顕著に改善される。こうした効果をより顕著にするためには、隣接試料分離部 706 間のパスの幅を、試料分離部 706 中の疎水性領域 705 間の間隙よりも大きくするのが良い。25 パスの幅は、疎水性領域 705 間の間隙の好ましくは 2~200 倍程度、よ

り好ましくは5～100倍程度とする。

なお、図63の例では、各試料分離部に同じサイズ、間隔の疎水性領域705を形成しているが、それぞれの試料分離部で、異なるそれぞれサイズ、間隔の疎水性領域705を形成してもよい。

分子サイズの物質を分離する場合、試料分離部間のパスの幅及び、試料分離部内の疎水性領域705の間隔は、分離しようとする成分（核酸、アミノ酸、ペプチド・タンパク質などの有機分子、キレートした金属イオンなどの分子・イオン）のサイズに合わせて適宜に選択される。たとえば疎水性領域705の間隔は、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と、疎水性領域705の間隔との差異を、100nm以内、より好ましくは50nm以内、最も好ましくは10nm以内とする。第一の領域の間隔を適切に設定することにより、分離能が一層向上する。

隣接する試料分離部706間の間隔（パスの幅）は、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と試料分離部間の間隔との差異を、当該分子の慣性半径の10%以内、より好ましくは5%以内、最も好ましくは1%以内とする。試料分離部706間の間隔が広すぎると、サイズの小さい分子の分離が充分に行われなくなることがあり、試料分離部706間の間隔が狭すぎると、目詰まりが発生しやすくなる場合がある。

また、上記実施形態では疎水性領域を一定間隔で配設した例を示したが、試料分離部706内において疎水性領域を異なる間隔で配設することもできる。こうすることで大・中・小等の複数の大きさの分子またはイオンを効率的に分離することができる。また、疎水性領域の配置に関し、試料の進行方向に対して互い違いに疎水性領域を配置する方法を採用することも有効である。こうすることにより、目的の成分を効率的に分離することができる。

また、本実施形態においても、以上で述べた他の実施形態と同様、図22に示すように、分離用流路112の両端に電圧が印加され、これにより試料が分離用流路112中を移動する。ここで、試料に外力を与えるための電圧以外に、電気浸透流を抑制するための電圧を印加してもよい。図22の構成5では、この目的のため、基板にゼータ補正電圧を印加している。このようにすれば電気浸透流が抑制され、測定ピークのプロードニングを有効に防止することができる。

次に、本実施形態のマイクロチップの製造方法について、図21のマイクロチップ307の流路形状を例に、図64～図69を用いて説明する。

10 図21の流路形状は、まず、図64(a)に示すように、基板701表面に溝部730を設け、次いで図64(b)のように、溝部730中の所定箇所に試料分離領域731を形成することにより得られる。以下、図64(a)の基板701上に溝部730を形成する工程について図65を参照して説明する。なお、本実施例では基板701としてガラス基板を用いた例について説明する。

15 初めに、基板701上にハードマスク770、レジストマスク771を順次形成する(図65(a))。次いで、レジストマスク771に所定の開口部を設ける(図65(b))。続いて、開口部を設けたレジストマスク771をマスクとしてドライエッティングを行い、図65(c)の状態とする。エッティングガスとしては、SF<sub>6</sub>などを用いる。続いて、バッファードフッ酸などのエッティング液を用いて、基板701をウェットエッティングする。通常、エッティング深さを1μm程度とする。図65(d)は、このエッティングが終了した状態を示す。最後にハードマスク770及びレジストマスク771を除去する(図65(e))。以上の工程により図64(a)に示すような溝部720が形成される。

20 図64(a)における溝部730の形成工程において、溝部730の表面を親水性とし、それ以外の基板701表面を疎水表面とすることもできる。以下、このような構造の形成工程について図66を参照して説明する。まず、

図 6 5 (e) で得られた構造に対して、全面に疎水性表面処理膜 720 を形成する（図 6 6 (a)）。疎水性表面処理膜 720 を構成する材料としては、たとえば、3-チオールプロピルトリエトキシシランが例示される。

続いて基板表面にレジスト 721 をスピンコート法により塗布・乾燥する  
5 (図 6 6 (b))。次いで溝部に対応してレジスト 721 に開口部を設ける（図  
6 6 (c))。次に、開口部を設けたレジスト 721 をマスクとして、ドライ  
エッティングを行う（図 6 6 (d))。その後、レジスト 721 をアッシング及  
び剥離液処理により除去する。以上の工程を実施することにより図 6 6 (e)  
10 の状態となる。すなわち、試料流路溝の内壁は、ガラス材料からなる基板 7  
01 の親水性表面が露出する一方、それ以外の部分は疎水性表面処理膜 720  
により覆われた構造となる。このため、キャリア溶媒として親水性溶媒を  
用いれば、試料が溝の外部に流出することがない。

続いて、図 6 4 (b) における試料分離領域 731 の形成工程について図  
6 7 を参照して説明する。初めに、図 6 7 (a) のように、基板 701 上に  
15 電子ビーム露光用レジスト 702 を形成する。続いて、電子ビームを用い、  
電子ビーム露光用レジスト 702 を所定の形状にパターン露光する（図 6 7  
(b))。露光部分を溶解除去すると、図 6 7 (c) のように所定の形状にパ  
ターニングされた開口部が形成される。その後、図 6 7 (d) のように酸素  
20 プラズマアッシングを行う。なお、酸素プラズマアッシングは、サブミクロ  
ンオーダーのパターンを形成する際には必要となる。酸素プラズマアッシング  
を行えばカップリング剤の付着する下地が活性化し、精密なパターン形成  
に適した表面が得られるからである。一方、ミクロンオーダー以上の大さな  
パターンを形成する場合においては必要性が少ない。

アッシング終了後、図 6 8 (a) の状態となる。図中、親水性領域 703  
25 はレジスト残さおよび汚染物が堆積して形成されたものである。この状態で、  
疎水性領域 705 を形成する（図 6 8 (b))。疎水性領域 705 を構成する  
膜の成膜法としては、たとえば気相法を用いることができる。この場合、密  
閉容器中に基板 701 と疎水基を有するカップリング剤を含む液とを配置

し、所定時間放置することにより膜を形成する。この方法によれば、基板 7  
0 1 の表面に溶剤等が付着しないため、所望どおりの精密なパターンの処理  
膜を得ることができる。他の成膜法としてスピンドルコート法を用いることもで  
きる。この場合、疎水基を有するカップリング剤溶液を塗布して表面処理を  
5 行い、疎水性領域 7 0 5 を形成する。疎水基を有するカップリング剤として  
は、3-チオールプロピルトリエトキシシランを用いることができる。成膜  
方法として、ほかにディップ法等を用いることもできる。疎水性領域 7 0 5  
は、親水性領域 7 0 3 の上部には堆積せず、基板 7 0 1 の露出部のみに堆積  
するため、図 6 1 に示すように、多数の疎水性領域 7 0 5 が離間して形成さ  
10 れた表面構造が得られる。

以上述べたプロセスの他、以下のような方法により上記と同様の表面構造  
を得ることもできる。この方法では、図 6 7 (c) のようにパターニングさ  
れた未露光部 7 0 2 a を形成した後、酸素プラズマアッシングを行わずに図  
6 9 (a) のようにレジスト開口部に 3-チオールプロピルトリエトキシシラン  
15 を堆積して疎水性領域 7 0 5 を形成する。その後、未露光部 7 0 2 a を  
選択的に除去できる溶媒を用い、ウェットエッティングを行って、図 6 9 (b)  
の構造を得る。この際、溶媒としては、疎水性領域 7 0 5 を構成する膜に損  
傷を与えないものを選択することが重要である。このような溶媒として、た  
とえばアセトン等を例示することができる。

20 上記実施の形態では、流路溝部に疎水性領域を形成したが、これ以外に以  
下のような方法を採用することもできる。まず図 7 0 (a)、(b) のように  
二種類の基板を用意する。図 7 0 (a) の基板は、ガラス基板 9 0 1 上に 3  
-チオールプロピルトリエトキシシラン等の疎水基を有する化合物からな  
る疎水性膜 9 0 3 が形成された構成となっている。疎水性膜 9 0 3 は、所定  
25 のパターニング形状にて形成される。この疎水性膜 9 0 3 の設けられた箇所  
が試料分離部となる。一方、図 7 0 (b) の基板は、ガラス基板 9 0 2 表面  
にストライプ状の溝が設けられた構成となっている。この溝の部分が試料流  
路となる。疎水性膜 9 0 3 の形成方法は、上述のとおりである。ガラス基板

902 表面にストライプの溝も上述のように、マスクを用いたウェットエッチングにより容易に作製することができる。これらを図71のように張り合わせることによって、本実施形態の構成を得ることができる。2枚の基板によって形成される空間904が試料流路となる。この方法によれば、平坦な表面に疎水性膜903を形成することとなるので、製造が容易であり、製造安定性が良好である。

5 カップリング剤膜の作製方法としては、たとえばLB膜引き上げ法により基板全面にシランカップリング剤からなる膜を形成し、親水性／疎水性のマイクロパターンを形成する方法を用いることができる。

10 さらに、本実施形態において、試料分離領域には一つの疎水性領域のみを設けることもできる。この場合、たとえば、親水性表面を有する分離用流路内に、試料の流れ方向に延在する一つの疎水性領域を形成することもできる。このようにしても、試料が分離用流路を通過する際に、試料分離領域の表面特性によって試料を分離することができる。

15 さらに、上述した疎水性処理および親水性処理により流路自体を形成することもできる。

疎水性処理により流路を形成する場合、ガラス基板など親水性の基板を用いて、流路の壁に相当する部分を疎水性領域で形成する。親水性である緩衝液は、疎水性領域を避けて進入するため、壁部分の間に流路が形成される。20 流路には被覆を被せても被せなくてもよいが、被覆を被せる場合は基板から数 $\mu\text{m}$ の隙間をあけるのが好ましい。隙間は被覆の断端付近をのりしろとして、PDMSやPMMAなどの粘稠性の樹脂をのりとして基板に接着することで実現できる。断端付近だけの接着でも、緩衝液を導入すると疎水性領域が水をはじくため、流路が形成される。

一方、親水性処理により流路を形成する場合、疎水性の基板、もしくはシリザン処理等で疎水性とした基板表面に親水性の流路を形成する。この場合も、親水性領域にのみ緩衝液が進入するので親水性領域を流路とすることができる。

さらに、この疎水性処理、あるいは親水性処理はスタンプやインクジェットプリントなどの印刷技術を用いて行うこともできる。スタンプによる方法では、PDMS樹脂を用いる。PDMS樹脂はシリコーンオイルを重合して樹脂化するが、樹脂化した後も分子間隙にシリコーンオイルが充填された状態となっている。そのため、PDMS樹脂を親水性の表面、例えば、ガラス表面に接触させると、接触した部分が強い疎水性となり水をはじく。これを利用して、流路部分に対応する位置に凹部を形成したPDMSブロックをスタンプとして、親水性の基板に接触させることにより、前記の疎水性処理による流路が簡単に製造できる。

10 インクジェットプリントによる方法では、粘稠性が低いタイプのシリコーンオイルをインクジェットプリントのインクとして用い、印刷紙として親水性の樹脂薄膜、例えばポリエチレン、PET、酢酸セルロース、セルロース薄膜（セロハン）などを用いる。流路壁部分にシリコーンオイルが付着するようなパターンに印刷することによっても同じ効果が得られる。

15 さらに、疎水性処理および親水性処理により、所定形状の疎水性パッチまたは親水性パッチを形成し、特定のサイズ未満の物質を通過させ、特定のサイズ以上の物質を通過させないようなフィルタを流路中に形成することもできる。

20 例えば疎水性パッチによりフィルタを構成する場合、パッチを一定の間隔をあけて直線的に繰り返し配置することにより、破線状のフィルタパターンを得ることができる。疎水性パッチどうしの間隔は、通過させたい物質のサイズよりも大きく、通過させたくない物質のサイズよりも小さくする。例えば $100\mu m$ 以上の物質を除去したい場合、疎水性パッチどうしの間隔は、 $100\mu m$ より狭く、例えば $50\mu m$ に設定する。

25 フィルタは、流路を形成するための疎水性領域パターンと、前記、破線状に形成された疎水性パッチのパターンを一体に形成することで実現できる。形成方法としては、前述のフォトリソグラフィーとSAM膜形成による方法、スタンプによる方法、インクジェットによる方法等を適宜用いることができ

る。

なお、流路中にフィルタを構成する場合、流れ方向に対して垂直にフィルタ面を設けてもよく、流れ方向に平行にフィルタ面を設けてもよい。フィルタ面を流れ方向に平行に設ける場合は、垂直に設ける場合と比べて、物質が詰まりにくく、フィルタの面積を広く取れるという長所がある。この場合、  
5 流路部分の幅を広めに、たとえば  $1000 \mu\text{m}$  とし、その中央部分に  $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  の正方形の疎水性パッチを、互いに  $50 \mu\text{m}$  の隙間を有するよう流路の流れの方向に形成することで、流路を流れ方向に並行に 2 分割することができる。分割された流路の一方の側から、分離したい物質を含む液体を導入すると、その液体に含まれる  $50 \mu\text{m}$  よりも大きな物質が除かれた濾液が、他方の流路に流出する。これにより、流路の一方の側で物質を濃縮することができる。

#### (第十の実施形態)

質量分析システム 351 に用いるマイクロチップとして、分離領域を備えた流路が複数設けられ、その流路と交差し、かつ当該分離領域に試料を導入する目的の試料導入用流路が設けられた形態を採用することもできる。図 7  
15 2 に示される流路構成はその一例である。この流路構成には、柱状体、凹部、または親疎水性領域を備えた分離領域 423 を有する流路 409 が複数設けられている。分離対象試料は、試料導入口 424 から導入され、リザーバー 425 へ向かって拡散する。試料導入口 424 とリザーバー 425 との間の流路 426 は分離能を賦与されておらず、分離能を有する複数の流路 409 へ試料を運ぶためのものである。試料が流路 426 に満たされた後、リザーバー 427 からリザーバー 428 方向へ試料を泳動させることにより、同時に分離を実行することができるため、分離効率が向上する。また各流路 4  
20 09 に、異なる特性をもつ分離領域 423 を備えることにより、試料を種々の特性に応じて同時に分離することが可能となる。さらに図 73 のようにリザーバー 427 を一つとした形態を採用することもできる。この例の場合、リザーバー 427 から全ての流路 409 に緩衝液を注入することができる。

ため、効率的である。

図72または図73の構成は、試料分離部の形態が上述の第一～第九の実施形態のいずれの態様である場合にも採用することができる。さらに、図72または図73に示される形態においては、分離領域が設けられた流路と試料導入用流路とが交差する箇所に第五の実施形態に記載したようにピラーメッシュを配設することもできる。図74はその一例を示す図である。流路409と流路426との交差点において、ピラーメッシュ429には複数の微少なピラーが配設されている。このピラーメッシュ429は濾過機能を有しており、ピラーのピッチを制御することにより、所望する範囲の大きさの分子のみを分離領域423へと通過させることができるために、所望の分析を迅速かつ正確に実施することができる。なお、図74においては、分離領域が設けられた流路と試料導入用流路とが直交している例を示したが、これに限られず、任意の角度で交わった構成としても上記の効果を得ることができる。

また、ピラーメッシュ429を備えた場合、弱い駆動力（たとえば微弱な電界）を分離対象の分子群に与えることによって、泳動を開始する前においては図75(a)に示されるように広がっていた試料は、ピラーメッシュ429によって堰き止められる。このため、図75(b)のように当該分子群は濃縮され、細いバンドを形成する。次に、一時的に強い駆動力（たとえば強い電界）を分離対象の分子群に与えると、当該分子群は濃縮された状態を保ちつつピラー列を通過する。これは、特にDNAやタンパク質のような高分子の場合、分子サイズがピラー同士の間隔よりも大きい場合であっても、ピラー列が一列ないし数列程度であれば当該分子は伸長することによりピラー間をすり抜けることができることによる（レプロテーション効果）。当該分子群は、ピラーメッシュ429を通過後も細いバンド状態を保っているため、分離後のピークの重なりが少なくなることから高精度の分離が実現する。なお、流路409のリザーバー427に試料を直接投入しても図75(b)のように、充分細いバンドが得られるため、投入用流路が不要であるという

特長もある。

なお、図74および図75においては、分離領域が設けられた流路と試料導入用流路とが直交している例を示したが、これに限られず、任意の角度で交わった構成としても上記の効果を得ることができる。

##### 5 (第十一の実施形態)

図1の質量分析システム351に適用するマイクロチップにおいて、基板に試料を吸着させるための微粒子を付着させて、試料分離部を構成してもよい。図76(a)は、本実施形態に係るマイクロチップの上面図であり、図76(b)は図76(a)の試料分離部347のE-E'方向の断面の様子を説明する図である。図76(a)において、基板110に分離用流路112が設けられており、その両端に液溜め101aおよび101bが形成されている。分離用流路112には、微粒子が充填された試料分離部347が設けられている。試料分離部347に充填する微粒子としては、TLC(薄層クロマトグラフィー)において吸着剤として用いる材料等を用いることができる。具体的には、たとえば、シリカゲル、アルミナ、セルロース等を用い、粒径はたとえば5~40nmとすることができる。

たとえば微粒子としてシリカゲルを用いる場合、試料分離部347へのシリカゲル粉体の充填は、分離用流路112の下流側に堰き止め部材を設けた上で、シリカゲル粉体、バインダ、および水の混合体を流路に流し込み、その後、この混合体を乾燥、固化させることにより、行うことができる。

このような試料分離部347を有するマイクロチップを用いた分離は次のようにして行う。まず、マイクロチップが乾燥した状態で、試料を試料分離部347の液溜め101a側の端部に上面からスポットする。試料のスポット量は、たとえば1μL~10μL程度とする。こうすれば、質量分析を行うのに充分な試料量が確保される。また、スポット幅を好適な細さとすれば、好適な分離能が発揮される。そして、試料がある程度乾燥した段階で、液溜め101aに所定量の展開液を導入する。すると、導入された展開液は、毛細管現象により分離用流路112に導入される。さらに、分離用流路11

2から毛細管現象により試料分離部347の微粒子の間隙に浸透する。

このとき、試料分離部347中を下流すなわち液溜め101b側に向かって浸透していく展開液の流れによって、試料分離部347にスポットされた試料が移動する。このとき、試料中の成分のうち、展開液との親和性が高い成分ほど速やかに移動し、親和性に応じて展開される。こうして試料中の成分を分離後、第一の実施形態と同様にして試料分離部347に沿ってレーザー光を照射すれば、試料の各成分について質量分析を行うことができる。本発明の方法では、展開後、試料分離部347が速やかに乾燥するため、より一層効率よく質量分析のステップに移行することが可能である。

なお、図76(a)においては、分離用流路112に微粒子を充填したが、基板の表面に吸着剤を付着させた構成でもよく、特に流路を設ける構成には限定されない。

#### (第十二の実施形態)

本実施形態は、質量分析システムの別の構成に関する。本実施形態の質量分析システムには、第一～第十一の実施形態で説明したマイクロチップのうち、任意の構成のものを適用することができる。以下、図21のマイクロチップ307の流路構成で、分離用流路112に図6に示したピラー125が配設されたマイクロチップを用いる場合を例に説明する。なお、必要に応じて第四の実施形態で前述したピラーパッチを形成した分離用流路112としてもよい。

図77は、本実施形態に係る質量分析システムの構成を示す概略図である。図77の質量分析システム319は、質量分析装置301、マイクロチップ307、および変換部321、演算処理部333、そしてこれらを管理し、制御するシステム制御部309を含む。質量分析装置301は、レーザー光源305、光源支持部315、載置台325、カバー341、パッキン345、ギア343および検出部327を備える。マイクロチップ307は、載置台325上に設置される。

質量分析システム319を用いた質量分析は以下のようにして行う。まず、

マイクロチップ307を用いた後述の方法により、試料をマイクロチップの流路（図77では不図示）上で分離する。

そして、マイクロチップ307を載置台325にセットし、ギア343を調節し、載置台325を質量分析装置301のチャンバ内に挿入する。このとき、カバー341がチャンバの壁部に設けられたパッキン345に密着することにより、分析時にはチャンバ内の真空を好適に確保することができる。そして、載置台325または光源支持部315を調節し、マイクロチップ307またはレーザー光源305の位置調整を行う。

試料の分離されている流路に沿って真空下でレーザー光源305からレーザー光をスキャンし、分離された試料中の各成分について質量分析を行う。マイクロチップ307の流路中で分離された試料の各成分が気化する。載置台325は電極となっており、ここに電圧を印加することにより、気化した試料は真空中を飛行し、検出部327にて検出される。検出値は変換部321にてAD変換された後、演算処理部333にて所定の分析、解析が行われる。なお、マイクロチップの底面に金属膜を形成し、外部電源に接続可能な構成としてもよい。こうすれば、マイクロチップに電圧を印加することが可能となる。

質量分析システム319では、このようにマイクロチップ307上の流路で分離された試料が、流路上で連続して分析される。このため、複数の成分を含む試料を分離した後、各成分について効率よく質量分析を行うことができる。

次に、質量分析装置301およびマイクロチップ307を備える質量分析システムの構成と、このシステムを用いた分析、解析の流れについてさらに詳細に説明する。まず、図78は、質量分析システムの制御方法を説明するための図である。図78において、測定条件制御部311および解析条件設定部331はシステム制御部309によって管理される。

測定条件制御部311は、質量分析測定の各種条件を制御し、たとえばレーザー光源制御部313、マイクロチップ制御部317、検出部327およ

び変換部 321 を制御する。レーザー光源制御部 313 は、レーザー光の照射角度および照射強度を制御する。ここでは、レーザー光源 305 からの出射光強度およびレーザー光源 305 を支持する光源支持部 315 の角度または位置を調節する。

5 マイクロチップ制御部 317 は、マイクロチップ 307 を設置する載置台 325 の位置を調節する。こうすることにより、マイクロチップ 307 の分離用流路 112 に確実にレーザー光源 305 からレーザー光を照射することができる。なお、光照射の位置合わせの精度を高めるため、マイクロチップ 307 の所定の位置に位置合わせ用マーク（図 77 および図 21 では不図示）を設けておくことが好ましい。

10 検出部 327 は、レーザー光の照射によりイオン化した成分のフラグメントを検出する。このとき、たとえばレーザー光照射開始時点を時間の原点として、検出を開始する。こうすることにより、分離用流路 112 に沿ったレーザー光のスキャンと、スキャン位置に対応したイオン検出信号とが取得される。検出部 327 で検出されたイオン検出信号は変換部 321 にて A/D  
15 (アナログ→デジタル) 変換される。変換部 321 にて変換されたデータは演算処理部 333 に送出され、データ解析が行われる。また、データは測定データ記憶部 329 に保存される。

20 演算処理部 333 は、解析条件設定部 331 によって制御され、所定の解析を行う。このとき、比較データ等が記憶された参照データ記憶部 339 の情報を参照してもよい。解析結果は、測定データ記憶部 329 に記憶される。また、解析結果は出力部 335 から出力することもできるし、表示部 337 に表示させることもできる。

25 次に、図 79 は質量分析システムを用いた分析の流れを説明するための図である。図 79 に示したように、まず、試料中の夾雑物をある程度除去する粗精製 (S101)、を行う。そして、必要に応じて後述する前処理 (S102) を行った後、試料の分離を行う (S103)、そして、分離用流路 112 に沿ってレーザー光を照射してレーザーの照射位置 (バンド) の成分を

イオン化し、質量分析を行う（S104）。質量分析後、各成分について得られたフラグメントからフラグメントパターンを分析し（S105）、得られたデータの解析を行う（S106）。ステップ106のデータ解析の際に、参照データ記憶部339に格納されたデータベースを参照する。

5 ステップ102における前処理としては以下の処理があげられる。たとえば分子内ジスルフィド結合を有する成分の質量分析を行う場合に、DTT（ジチオスレイトール）等の還元試薬を含むアセトニトリル等の溶媒中で還元反応を行ってもよい。なお、還元後、チオール基をアルキル化等により保護し、再び酸化するのを抑制することが好ましい。

10 また、質量分析装置301の分析方式に適した分子量よりも試料中の成分が高分子量である場合には、トリプシン等のタンパク質加水分解酵素を用いて還元処理されたタンパク質分子の低分子化処理を行ってもよい。低分子化は磷酸バッファー等の緩衝液中で行われるため、反応後、脱塩および高分子画分すなわちトリプシンの除去を行ってもよい。また低分子化を施す場合にも、あらかじめ還元処理を行うことが好ましい。こうすれば、より一層精度よい測定が可能となる。

15 また、トリプシン処理は、試料を分離した後に行ってもよい。試料を分離した後にトリプシン処理を行う場合、試料を分離された位置に固定化してもよい。固定化することにより、分離された試料の拡散が効果的に抑制されるため、低分子化の際にもバンド幅の拡大等を好適に抑制することができる。  
20 図85は、トリプシン処理の方法の一例を示す図である。図85（a）に示したように、基板110上に形成されたピラー125の表面に、固定化層391を形成しておく。ピラー125の材料としては、第一の実施形態で記載した材料を用いることができるが、たとえばシリコンまたは金属とする。固定化層391は、たとえばエポキシ基を有するシランカップリング剤を塗布することにより形成される。固定化層391を有するピラー125を用いて試料451を分離し、分離用流路112を乾燥させると、試料451は固定化層391のエポキシ基により固定化される。

そして、図 8 5 (b) に示したように、分離された試料 4 5 1 が分離用流路 1 1 2 に固定化された状態で、保温バス 3 9 3 中の酵素溶液 3 9 5 に浸漬し、所定の温度で酵素処理を行うと、試料 4 5 1 は分離された位置において低分子化される。このため、分離された成分ごとに断片の質量分析結果を得  
5 ことができる。

同一の試料 4 5 1 について、同一構成の二つの分離用流路 1 1 2 を用いて分離を行い、一方の分離用流路 1 1 2 で分離された試料 4 5 1 には図 8 5 を用いて上述した方法で低分子化処理を施した後にレーザー光を照射し、他方の分離用流路 1 1 2 で分離された試料 4 5 1 は低分子化を施さずにレーザー光を照射すれば、試料 4 5 1 中の成分そのもののフラグメントパターンと、  
10 低分子化された断片のフラグメントパターンの 2 種類の情報が成分ごとに得られる。二つの分離用流路 1 1 2 の同位置に検出されたバンドは同一の成分であると考えられるから、これらの 2 種類の情報を組み合わせて解析を行うことにより、さらに確実に成分の同定を行うことが可能となる。なお、二  
15 つの分離用流路 1 1 2 は、同一のマイクロチップ上に形成されていてもよいし、異なるマイクロチップ上に形成されていてもよい。

ステップ 1 0 3 における分離は、上述の方法により行う。なお、ステップ 1 0 2、ステップ 1 0 3 は、質量分析装置 3 0 1 の質量分析チャンバ内で行ってもよいし、質量分析装置 3 0 1 外部または前室にて行ってもよい。適宜  
20 質量分析装置 3 0 1 の外部で行ってもよい。

ステップ 1 0 4 における質量分析の手順を図 7 8 ~ 図 8 0 を参照して説明する。ステップ 1 0 3 (図 7 9) までのステップを、質量分析装置 3 0 1 の質量分析チャンバの外部で行った場合には、マイクロチップ 3 0 7 をセットした載置台 3 2 5 を質量分析チャンバに移動させ、質量分析チャンバ内に設置する (図 8 0 の S 2 0 1)。  
25

次に、マイクロチップ 3 0 7 の分離用流路 1 1 2 に沿って、レーザー光源 3 0 5 からレーザー光を照射する (図 8 0 の S 2 0 2)。このとき、載置台 3 2 5 は電界形成用の基板として用いられる。イオン化した試料成分の比電

荷 ( $m/z$ ) を検出部 327 にて検出する (S203)。

検出部 327において検出されたデータは、変換部 321 にて AD 変換等所定の変換を施される (S204)。そして、変換されたデータは測定データ記憶部 329 に保存される (S205)。

5 以上の質量分析 (図 79 の S104)において、マイクロチップ 307 の分離用流路 112 には、ピラー 125 が形成されているため、マトリックスを用いることなく高効率で試料をイオン化させることも可能となる。タンパク質溶液をマトリックス溶液と混合する必要がなく、分離用流路 112 にレーザー光を照射して、イオン化することができる。

10 図 79 のステップ 102 (前処理) ~ ステップ 104 (質量分析) の各ステップは、マイクロチップ 307 上で連続して行うことができる。そして、分離用流路 112 に沿って直接レーザー光を照射するため、試料を分離用流路 112 中で分離することにより得られた各バンド中の成分を分離用流路 112 から移動させることなく、質量分析を行うことができる。このため、15 試料が少量であっても、分離から質量分析までの各ステップを効率よく高い精度で行うことが可能である。

また、分離用流路 112 では、ピラー 125 を用いて試料を分離するため、従来電気泳動に用いるゲルやビーズ等の充填剤を用いる必要がない。このため、分離時には液体試料が分離用流路 112 内に保持されて乾燥が抑制されるとともに、レーザー光照射時には気化がスムーズに行われる。また、充填剤を用いた場合、充填剤がイオン化することにより測定時にバックグラウンドが上昇する可能性があるが、ピラー 125 を用いた分離用流路 112 においては、バックグラウンドの上昇が抑制される。なお、レーザー光照射時に分離用流路 112 由来成分がイオン化することを抑制するため、第一の実施形態で前述したように、分離用流路 112 表面の親水化にはシリコン熱酸化膜を用いることが好ましい。

また、質量分析は、マトリックスを用いる方式で行ってもよい。マトリックスは、測定対象物質に応じて適宜選択されるが、たとえば第一の実施形態

に記載の物質を用いることができる。

図79のステップ106におけるフラグメントパターンの解析は、図78における演算処理部333にて行われる、ステップ106におけるフラグメントパターンの解析方法の一例について図81および図82を用いて説明する。図81は、分離用流路112において分離された成分ごとに得られる質量分析のフラグメントパターンを示す図である。また、図82(a)と図82(b)とは、それぞれ異なる検体から抽出した試料について得られたフラグメントパターンである。

図81において、試料が分子量に基づいて分離されている場合、試料中の各成分について、分離用流路112上の位置と分子量について二次元マップを作成し、解析を行うことができる。すなわち、図82(a)、図82(b)では、チップ上の位置を横軸とし、分子量を縦軸として2次元的に示したマップが示されている。縦軸については、各成分のフラグメントパターンのうち、検出強度が最大(ピーク)のm/zを黒塗りで示している。このようすれば、図82(a)と図82(b)とのフラグメントパターンの相違を利用して、検体間で異なる成分及び異なる部位を容易に特定することが可能である。たとえば、所定のタンパク質、DNA等に変位が生じる場合、その成分を質量分析した際のフラグメントパターンでピークとなるフラグメントが変化するからである。また、フラグメントパターンを解析することにより、変異が生じた成分およびその部位の同定も可能となる。このような解析結果は、たとえば診断などの有用な指針として提供することができる。また、有用物質のスクリーニング等にも応用することができる。

以上のように、質量分析システム319によって、試料の分離から各成分の同定までのステップが精度よく迅速に実現される。試料が微量であっても、各成分を高感度で検出可能である。また、各成分のフラグメントパターンの取得および結果の解析を効率よく行うことが可能であり、幅広い情報を得ることができる。

なお、質量分析システム319では、分離は質量分析装置301外部で行

い、質量分析装置 301 の質量分析チャンバにセットしたが、質量分析装置 301 に前室が設けられた構成としてもよい。

図 83 は、質量分析システムの別の構成を示す図である。図 83 では、質量分析チャンバに隣接する前室が設けられており、マイクロチップによる試料の分離は装置外部または前室内で行う。このため、質量分析チャンバ内を 5 予め減圧しておくことができる。

分離後、マイクロチップのセットされた載置台を有する前室を減圧する。前室は質量分析チャンバより小型であるため、速やかに所定の真空度に到達する。そして、移動機構により前室から質量分析チャンバへ載置台を移動し、 10 所定の位置にセットする。

流路中の成分のイオン化は、質量分析システム 319 (図 77) と同様に、レーザー光源からレーザー光を流路 (不図示) に沿って照射してなされる。載置台を基板として所定の電圧を付与することによってイオン化したフラグメントが検出部に到達し、検出される。検出値は解析部にて解析される。 15 載置台、光源支持部、レーザー光源、検出部、解析部は、制御部にて制御されている。

このように、図 83 の質量分析システムは、前室を備えているため、分離と質量分析を効率よく連続して行うことができる。

以上、本発明を実施形態に基づき説明した。これらの実施形態は例示であり様々な変形例が可能であること、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

たとえば、以上の実施形態においては分離用流路 112 において、成分の分子量に従って試料を分離する態様について説明したが、分子量に代わり、試料の等電点を用いて分離することもできる。

等電点を用いて分離を行う場合、試料は、あらかじめ所定のバッファーと 25 混合しておく。ここでいうバッファーとは、電界をかけると pH 勾配を形成する溶液であり、たとえばアマーシャルバイオサイエンス社の Amp h o l i n e や Pharmalyte 等を含む溶液が例示される。たとえば図 21

のマイクロチップ 307 を用いて分離を行う場合、この溶液が液溜め 101 a または液溜め 101 b に導入され、分離用流路 112 に導かれる。

なお、試料は、分離用流路 112 に形成される電界の方向に対して側方から試料が導入されてもよい。すなわち、液溜め 102 a または液溜め 102 b から等電点電解質を含む試料を導入することもできる。試料には、等電点電解質が含まれているため、電界の影響を受けて分離用流路 112 内に pH 勾配が形成される。このため、導入された試料は、分離用流路 112 において、各成分の等電点に応じてバンドに収束する。  
5

## 請求の範囲

1. 試料の通る流路および該流路に設けられた試料分離領域を有するマイクロチップと、  
5 前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、  
光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、  
を備えることを特徴とする質量分析システム。
- 10 2. 請求の範囲第1項に記載の質量分析システムにおいて、  
前記解析手段は、前記光照射位置と前記光照射位置に対応する前記質量分析データとを関連づけて記憶するデータ記憶部を含むことを特徴とする質量分析システム。  
3. 請求の範囲第1項または第2項に記載の質量分析システムにおいて、  
15 前記試料分離領域は、前記試料の分子量、等電位点または表面の疎水性に応じて前記試料を分離し、  
前記光照射手段は、前記試料分離領域中に分離された前記試料に沿って前記光照射位置を移動させながら前記レーザー光を照射するように構成されたことを特徴とする質量分析システム。
- 20 4. 請求の範囲第1項乃至第3項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路が基板の表面に設けられており、前記試料分離領域は複数の柱状体を有することを特徴とする質量分析システム。
- 25 5. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は、複数の前記柱状体が配設された柱状体配設部を複数含み、隣接する前記柱状体配設部間に前記試料が通過するパスが設けられたことを特徴とする質量分析システム。
6. 請求の範囲第5項に記載の質量分析システムにおいて、前記パスの幅は、前記柱状体配設部中の前記柱状体間の平均間隔よりも大きいことを特徴

とする質量分析システム。

7. 請求の範囲第5項または第6項に記載の質量分析システムにおいて、平面配置が略菱形になるように複数の前記柱状体配設部が組み合わせて配置され、それぞれの前記柱状体配設部の平面配置が略菱形となるように、前記柱状体が配置されていることを特徴とする質量分析システム。  
5

8. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に低くなっていることを特徴とする質量分析システム。

9. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に高くなっていることを特徴とする質量分析システム。  
10

10. 請求の範囲第4項乃至第9項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域と、前記試料分離領域よりも前記柱状体が疎に形成された調整領域とが、前記流路中の前記試料の進行方向に対して交互に形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
15

11. 請求の範囲第4項乃至第10項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記柱状体の表面に金属層が設けられていることを特徴とする質量分析システム。

12. 請求の範囲第4項乃至第10項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記柱状体は金属により構成されることを特徴とする質量分析システム。  
20

13. 請求の範囲第1項乃至第12項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記レーザー光は、赤外光レーザーまたは紫外光レーザーであることを特徴とする質量分析システム。

25 14. 請求の範囲第1項乃至3項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は複数の凹部を有することを特徴とする質量分析システム。

15. 請求の範囲第14項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料

分離領域中に、複数の前記凹部が設けられた突起部を具備することを特徴とする質量分析システム。

16. 請求の範囲第14項または15項に記載の質量分析システムにおいて、陽極酸化法により前記凹部が形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
5

17. 請求の範囲第1乃至第16項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面が親水化されたことを特徴とする質量分析システム。

18. 請求の範囲第17項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路  
10 の内壁の表面に親水性物質を付着させることにより、前記流路の内壁が親水化されていることを特徴とする質量分析システム。

19. 請求の範囲第17項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路の表面にシリコン熱酸化膜を形成することにより、前記流路の内壁が親水化されていることを特徴とする質量分析システム。

20. 請求の範囲第1項乃至第16項いずれかに記載の質量分析システム  
15 において、前記流路の内壁の表面が撥水化されたことを特徴とする質量分析システム。

21. 請求の範囲第1項乃至第3項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域の表面は、離間して配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く前記試料分離領域の表面を占める第二の領域と、を有し、前記第一の領域および前記第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする質量分析システム。  
20

22. 請求の範囲第21項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域を複数備えたことを特徴とする質量分析システム。

23. 請求の範囲第22項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記試料分離領域がストライプ状に配置されていることを特徴とする質量分析システム。  
25

24. 請求の範囲第21項乃至第23項いずれかに記載の質量分析システ

ムにおいて、前記疎水性領域は、疎水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする質量分析システム。

25. 請求の範囲第24項に記載の質量分析システムにおいて、前記疎水基を有する化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする質量分析システム。  
5

26. 請求の範囲第24項に記載の質量分析システムにおいて、前記疎水基を有する化合物は、シリコーン化合物であることを特徴とする質量分析システム。

27. 請求の範囲第21項乃至第24項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、ポリジメチルシロキサンブロックを親水性の前記流路の表面に接触させることにより、前記疎水性領域が形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
10

28. 請求の範囲第21項乃至第24項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、液状シリコーン化合物を親水性の前記流路の表面に印刷することにより、前記疎水性領域が形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
15

29. 請求の範囲第21項乃至第28項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、前記疎水性領域が配置された前記試料分離領域が形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
20

30. 請求の範囲第21項乃至第29項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記親水性領域は、親水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする質量分析システム。

31. 請求の範囲第30項に記載の質量分析システムにおいて、前記親水基を有する化合物は、親水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする質量分析システム。  
25

32. 請求の範囲第21項乃至第31項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを

設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、前記親水性領域が配置された前記試料分離領域が形成されたことを特徴とする質量分析システム。

33. 請求の範囲第1項乃至第32項いずれかに記載の質量分析システム  
5において、前記流路が複数設けられ、これらの前記流路と交差する液体試料導入用流路が設けられたことを特徴とする質量分析システム。

34. 請求の範囲第33項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路および前記液体試料導入用流路が交差する箇所と前記試料分離領域との間に、複数の柱状体が配設されていることを特徴とする質量分析システム。

10 35. 請求の範囲第1項乃至第34項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、柱状体が一列に配設された堰止部をさらに有することを特徴とする質量分析システム。

36. 請求の範囲第35項に記載の質量分析システムにおいて、前記堰止部が前記試料分離領域に隣接して配設されていることを特徴とする質量分析システム。  
15

37. 請求の範囲第1項乃至第36項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域が、スリットを介して複数に分割されたことを特徴とする質量分析システム。

38. 請求の範囲第1項乃至第37項いずれかに記載の質量分析システム  
20において、前記試料に外力を付与して前記試料を前記流路中で移動させる外力付与手段をさらに備えたことを特徴とする質量分析システム。

39. 請求の範囲第38項に記載の質量分析システムにおいて、前記外力が電気力であることを特徴とする質量分析システム。

40. 請求の範囲第38項に記載の質量分析システムにおいて、前記外力  
25が圧力であることを特徴とする質量分析システム。

41. 請求の範囲第1項乃至第37項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域に微細流路を形成し、前記流路から前記微細流路を経由して前記試料分離領域に、前記試料が毛細管現象により導入される

ように構成したことを特徴とする質量分析システム。

42. 請求の範囲第1項乃至第41項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の上部が、質量分析用マトリックスを含む薄膜によって被覆されていることを特徴とする質量分析システム。

5 43. 基板と、

該基板上に試料吸着用粒子を付着させ、試料を特定の性状にしたがって展開するようにした試料分離領域と、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、

10 光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、

を備えることを特徴とする質量分析システム。

44. 請求の範囲第43項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料吸着用粒子がシリカゲルであることを特徴とする質量分析システム。

15 45. 請求の範囲第43項または第44項に記載の質量分析システムにおいて、前記解析手段は、前記光照射位置と前記光照射位置に対応する前記質量分析データとを関連づけて記憶するデータ記憶部を含むことを特徴とする質量分析システム。

46. 試料分離領域を有するマイクロチップを用いて質量分析を行う分析方法であって、

試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を分離するステップと、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、

25 光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、

を含むことを特徴とする分析方法。

47. 請求の範囲第46項に記載の分析方法において、試料を分離する前

記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含み、第一の質量分析データを得るステップと、

5 試料を分離する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、

前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて前記試料の同定を行うステップと、

を含むことを特徴とする分析方法。

48. 請求の範囲第46項または第47項に記載の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、分離された前記試料を前記試料分離領域に固定化するステップを含むことを特徴とする分析方法。

49. 請求の範囲第46項乃至第48項いずれかに記載の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含むことを特徴とする分析方法。

50. 試料分離領域を有する基板を用いて質量分析を行う分析方法であつて、

20 試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を展開するステップと、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、

光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、

25 を含むことを特徴とする分析方法。

51. 請求の範囲第50項に記載の分析方法において、試料を展開する前記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含み、第一の質量分析データを得るステップと、

試料を展開する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、

前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて  
5 前記試料の同定を行うステップと、

を含むことを特徴とする分析方法。

5 2. 請求の範囲第 5 0 項または第 5 1 項に記載の分析方法において、試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、展開された前記試料を前記試料分離領域に固定化するステップを含むこと  
10 を特徴とする分析方法。

5 3. 請求の範囲第 5 0 項乃至第 5 2 項いすれかに記載の分析方法において、試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含むことを特徴とする分析方法。

## 補正書の請求の範囲

[2004年6月28日(28.06.04)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲  
4, 13-17, 20, 21, 33-42, 47-49, 及び51-53は補正された；  
出願当初の請求の範囲1-3, 46及び50は取り下げられた；新しい請求の  
範囲54, 55が加えられた。他の請求の範囲は変更なし。(11頁)]

## 請求の範囲

1. (削除)
2. (削除)
- 5 3. (削除)
4. (補正後) 試料の通る流路および該流路に設けられた試料分離領域を有するマイクロチップと、  
前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、  
10 光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、  
を備え、  
前記流路が基板の表面に設けられており、前記試料分離領域は複数の柱状体を有し、  
15 前記柱状体を有する前記試料分離領域に前記レーザー光が照射されることを特徴とする質量分析システム。
5. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域は、複数の前記柱状体が配設された柱状体配設部を複数含み、隣接する前記柱状体配設部間に前記試料が通過するバスが設けられたことを特徴と  
20 する質量分析システム。
6. 請求の範囲第5項に記載の質量分析システムにおいて、前記バスの幅は、前記柱状体配設部中の前記柱状体間の平均間隔よりも大きいことを特徴

とする質量分析システム。

7. 請求の範囲第5項または第6項に記載の質量分析システムにおいて、平面配置が略菱形になるように複数の前記柱状体配設部が組み合わせて配置され、それぞれの前記柱状体配設部の平面配置が略菱形となるように、前記柱状体が配置されていることを特徴とする質量分析システム。  
5

8. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に低くなっていることを特徴とする質量分析システム。

9. 請求の範囲第4項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記柱状体の密度が、前記流路中の前記試料の進行方向に向かって次第に高くなっていることを特徴とする質量分析システム。  
10

10. 請求の範囲第4項乃至第9項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域と、前記試料分離領域よりも前記柱状体が疎に形成された調整領域とが、前記流路中の前記試料の進行方向に対して交互に形成されたことを特徴とする質量分析システム。  
15

11. 請求の範囲第4項乃至第10項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記柱状体の表面に金属層が設けられていることを特徴とする質量分析システム。

12. 請求の範囲第4項乃至第10項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記柱状体は金属により構成されることを特徴とする質量分析システム。  
20

13. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第12項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記レーザー光は、赤外光レーザーまたは紫外光レーザーであることを特徴とする質量分析システム。

25 14. (補正後) 試料の通る流路および該流路に設けられた試料分離領域を有するマイクロチップと、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、

光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、  
を備え、

5 前記試料分離領域は複数の凹部を有し、前記凹部は前記流路に設けられた穴であることを特徴とする質量分析システム。

15. (補正後) 請求の範囲第14項に記載の質量分析システムにおいて、  
前記流路が基板の表面に設けられており、  
前記試料分離領域中に突起部を具備し、  
10 複数の前記凹部が流路壁から前記突起部にわたって所定のピッチで設け  
られたことを特徴とする質量分析システム。

16. (補正後) 請求の範囲第14項または第15項に記載の質量分析システムにおいて、陽極酸化法により前記流路の表面に設けられた金属の酸化被膜層に前記凹部が形成されたことを特徴とする質量分析システム。

17. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第16項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面が親水化されたことを特徴とする質量分析システム。

18. 請求の範囲第17項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面に親水性物質を付着させることにより、前記流路の内壁が親水化されていることを特徴とする質量分析システム。

19. 請求の範囲第17項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路の表面にシリコン熱酸化膜を形成することにより、前記流路の内壁が親水化されていることを特徴とする質量分析システム。

20. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第16項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の内壁の表面が撥水化されたことを特徴とする質量分析システム。

21. (補正後) 試料の通る流路および該流路に設けられた試料分離領域を有するマイクロチップと、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、

光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、  
を備え、

前記試料分離領域の表面は、離間して配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く前記試料分離領域の表面を占める第二の領域と、を有し、  
前記第一の領域および前記第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする質量分析システム。

22. 請求の範囲第21項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域を複数備えたことを特徴とする質量分析システム。

23. 請求の範囲第22項に記載の質量分析システムにおいて、複数の前記試料分離領域がストライプ状に配置されていることを特徴とする質量分析システム。

24. 請求の範囲第21項乃至第23項いずれかに記載の質量分析シス

設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、前記親水性領域が配置された前記試料分離領域が形成されたことを特徴とする質量分析システム。

33. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第32項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路が複数設けられ、これらの前記流路と交差する液体試料導入用流路が設けられたことを特徴とする質量分析システム。  
5

34. (補正後) 請求の範囲第33項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路および前記液体試料導入用流路が交差する箇所と前記試料分離領域との間に、

10 所定の大きさの分子を通過させるピラーメッシュを備え、  
前記ピラーメッシュは複数の柱状体が配設されてなることを特徴とする質量分析システム。

35. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第34項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、柱状体が一列に配設され試料をバンド状に濃縮する堰止部をさらに有することを特徴とする質量分析システム。  
15

36. (補正後) 請求の範囲第35項に記載の質量分析システムにおいて、前記堰止部が前記試料分離領域に隣接して配設され、バンド状に濃縮された前記試料が前記試料分離領域で分離されるように構成されていることを特徴とする質量分析システム。

20 37. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第36項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域が、スリットを介して複数に分割されたことを特徴とする質量分析システム。

38. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第37項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料に外力を付与して前記試料を前記流路中で移動させる外力付与手段をさらに備えたことを特徴とする質量分析システム。  
25

39. (補正後) 請求の範囲第38項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路が基板の表面に設けられており、  
前記基板の表面に設けられ前記流路に連通する複数の液溜めと、

前記液溜め近傍の前記基板上に設けられた伝導路と、

前記液溜めの壁面から前記伝導路にわたって設けられ、前記伝導路に圧着された電極と、

を備え、

5 前記外力が複数の前記液溜めの間に印加される電気力であることを特徴とする質量分析システム。

40. (補正後) 請求の範囲第38項に記載の質量分析システムにおいて、前記流路の一部に設けられた液溜めと、

前記液溜めに設けられた、オスジョイントおよびメスジョイントの組合せからなるジョイント部と、

前記ジョイント部を介して前記液溜めと連通する配管チューブと、  
をさらに備え、

前記外力付与手段によって、前記配管チューブ、前記ジョイント部および前記液溜めの内部に圧力が印加されるように構成されたことを特徴とする質量分析システム。

41. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第37項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記試料分離領域に微細流路を形成し、前記流路から前記微細流路を経由して前記試料分離領域に、前記試料が毛細管現象により導入されるように構成したことを特徴とする質量分析システム。

42. (補正後) 請求の範囲第4項乃至第41項いずれかに記載の質量分析システムにおいて、前記流路の上部に、質量分析用マトリックスを含み薄膜状に成形された被覆が設けられていることを特徴とする質量分析システム。

5 43. 基板と、

該基板上に試料吸着用粒子を付着させ、試料を特定の性状にしたがって展開するようにした試料分離領域と、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射する光照射手段と、

10 光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得る解析手段と、

を備えることを特徴とする質量分析システム。

44. 請求の範囲第43項に記載の質量分析システムにおいて、前記試料吸着用粒子がシリカゲルであることを特徴とする質量分析システム。

15 45. 請求の範囲第43項または第44項に記載の質量分析システムにおいて、前記解析手段は、前記光照射位置と前記光照射位置に対応する前記質量分析データとを関連づけて記憶するデータ記憶部を含むことを特徴とする質量分析システム。

46. (削除)

20 47. (補正後) 試料分離領域を有するマイクロチップを用いて質量分析を行う分析方法であって、

試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を分離するステップと、

25 前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、

光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、

試料を分離する前記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含

み、第一の質量分析データを得るステップと、

試料を分離する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、

5 前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて前記試料の同定を行うステップと、  
を含むことを特徴とする分析方法。

48. (補正後) 請求の範囲第47項に記載の分析方法において、

前記試料分離領域はエポキシ基を有する化合物を含む固定化層を有し、

10 試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、分離された前記試料を前記試料分離領域に前記化合物により固定化するステップを含むことを特徴とする分析方法。

49. (補正後) 請求の範囲第47項または第48項に記載の分析方法において、試料を分離する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に、ネプライザガスの圧力または電圧を用いて質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含むことを特徴とする分析方法。

50. (削除)

51. (補正後) 試料分離領域を有する基板を用いて質量分析を行う分析方法であって、

試料の特定の性状にしたがって前記試料分離領域に前記試料を展開するステップと、

前記試料分離領域に沿って光照射位置を移動させながらレーザー光を照射するステップと、

25 光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、質量分析データを得るステップと、

試料を展開する前記ステップの後、前記試料を低分子化するステップを含み、第一の質量分析データを得るステップと、

試料を展開する前記ステップの後、低分子化する前記ステップを行うことなくレーザー光を照射する前記ステップを行い、光照射により生じた前記試料のフラグメントを解析し、第二の質量分析データを得るステップと、  
5

前記第一の質量分析データおよび前記第二の質量分析データに基づいて前記試料の同定を行うステップと、

を含むことを特徴とする分析方法。

5 2. (補正後) 請求の範囲第 5 1 項に記載の分析方法において、

10 前記試料分離領域はエポキシ基を有する化合物を含む固定化層を有し、

試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、展開された前記試料を前記試料分離領域に前記化合物により固定化するステップを含むことを特徴とする分析方法。

5 3. (補正後) 請求の範囲第 5 1 項または第 5 2 項に記載の分析方法に

15 おいて、試料を展開する前記ステップの後、レーザー光を照射する前記ステップの前に、前記試料分離領域に、ネプライザーガスの圧力または電圧を用いて質量分析用マトリックスを噴霧するステップを含むことを特徴とする分析方法。

5 4. (追加) 請求の範囲第 4 項乃至第 4 2 項いずれかに記載の質量分析

20 システムにおいて、

前記解析手段は、前記光照射位置と前記光照射位置に対応する前記質量分析データとを関連づけて記憶するデータ記憶部を含むことを特徴とする質量分析システム。

5 5. (追加) 請求の範囲第 4 項乃至第 4 2 項いずれかに記載の質量分析

25 システムにおいて、

前記試料分離領域は、前記試料の分子量、等電位点または表面の疎水性に応じて前記試料を分離し、

前記光照射手段は、前記試料分離領域中に分離された前記試料に沿って前

記光照射位置を移動させながら前記レーザー光を照射するように構成されたことを特徴とする質量分析システム。

Fig.1

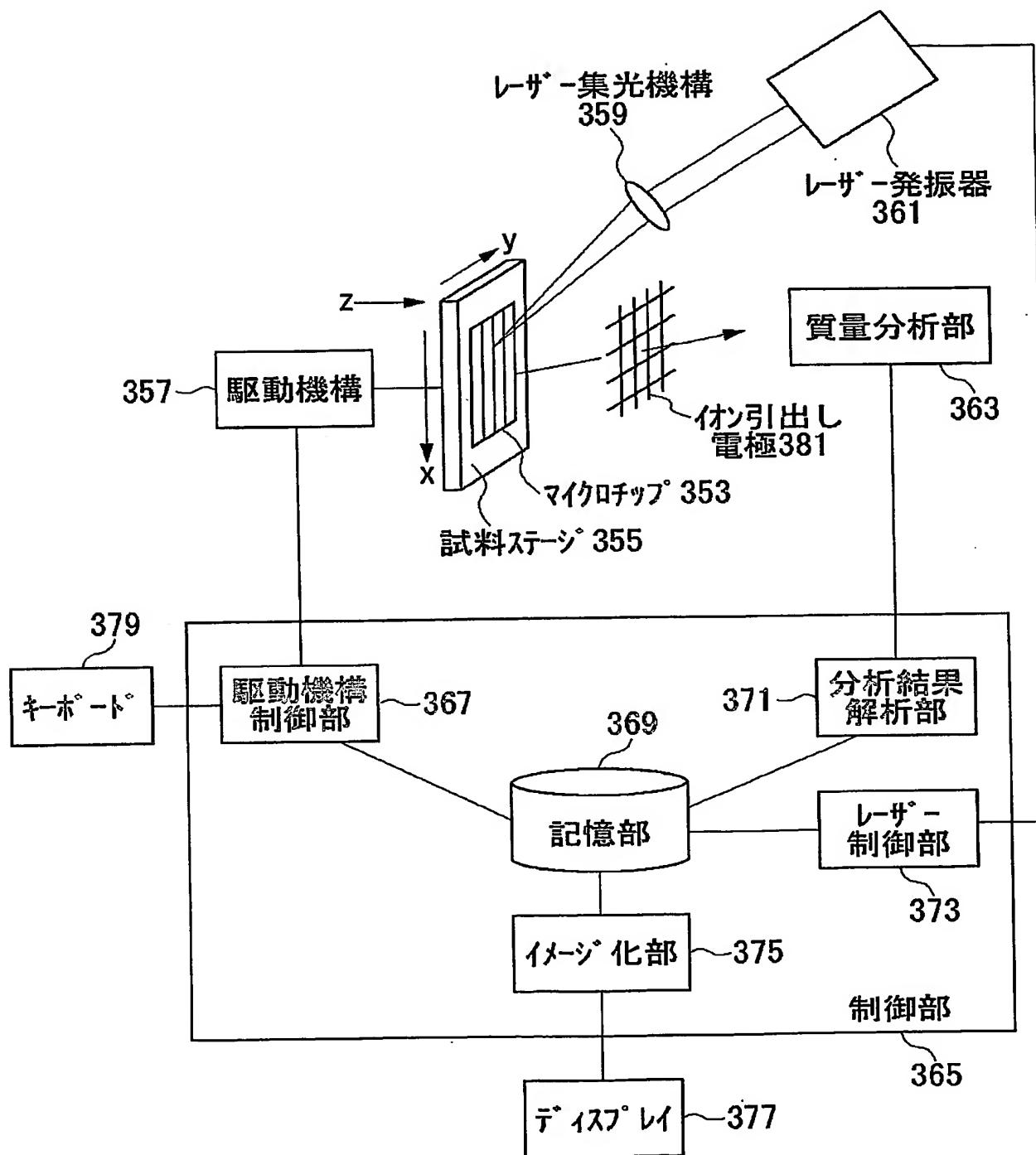


Fig.2

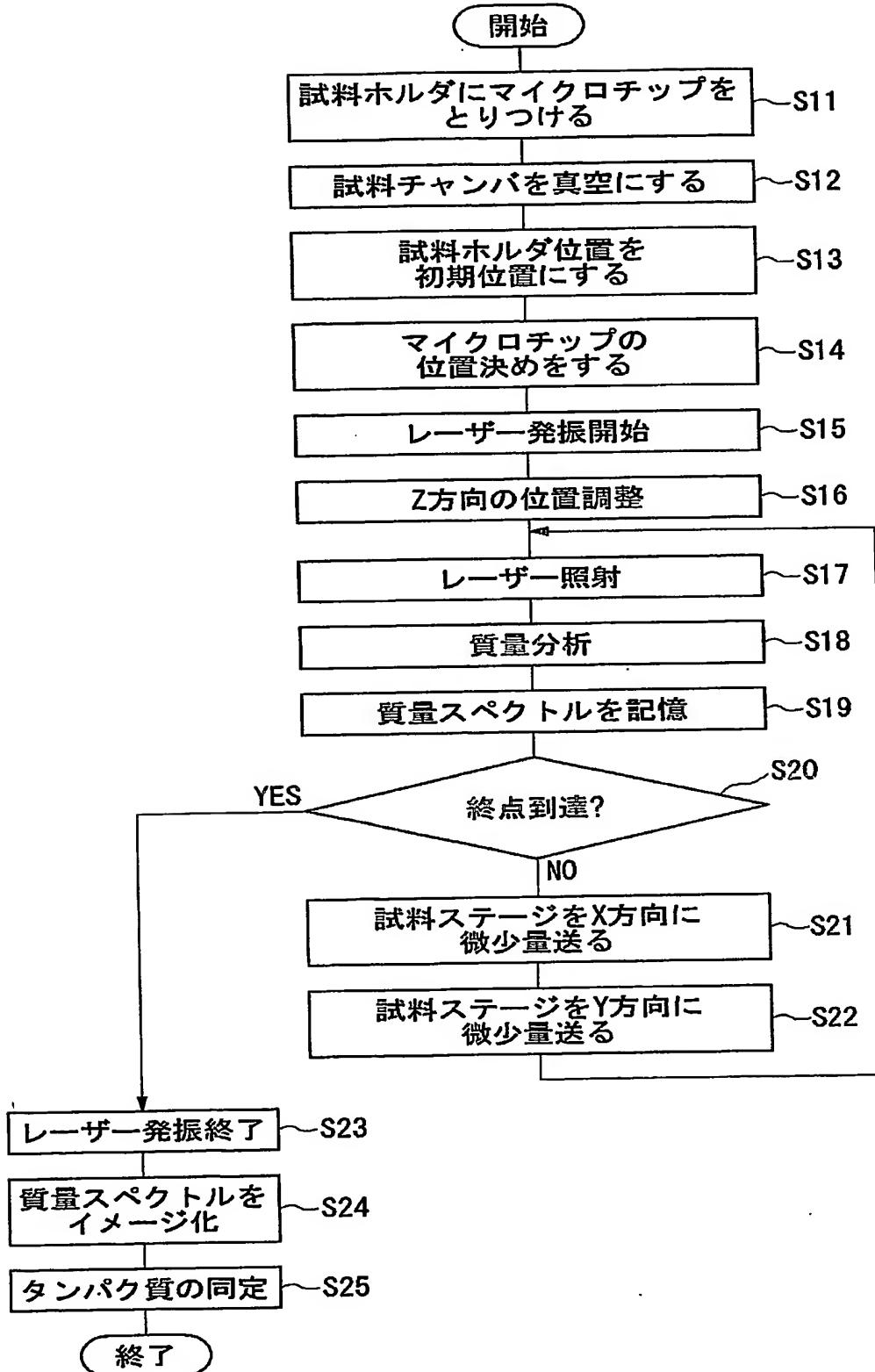


Fig.3

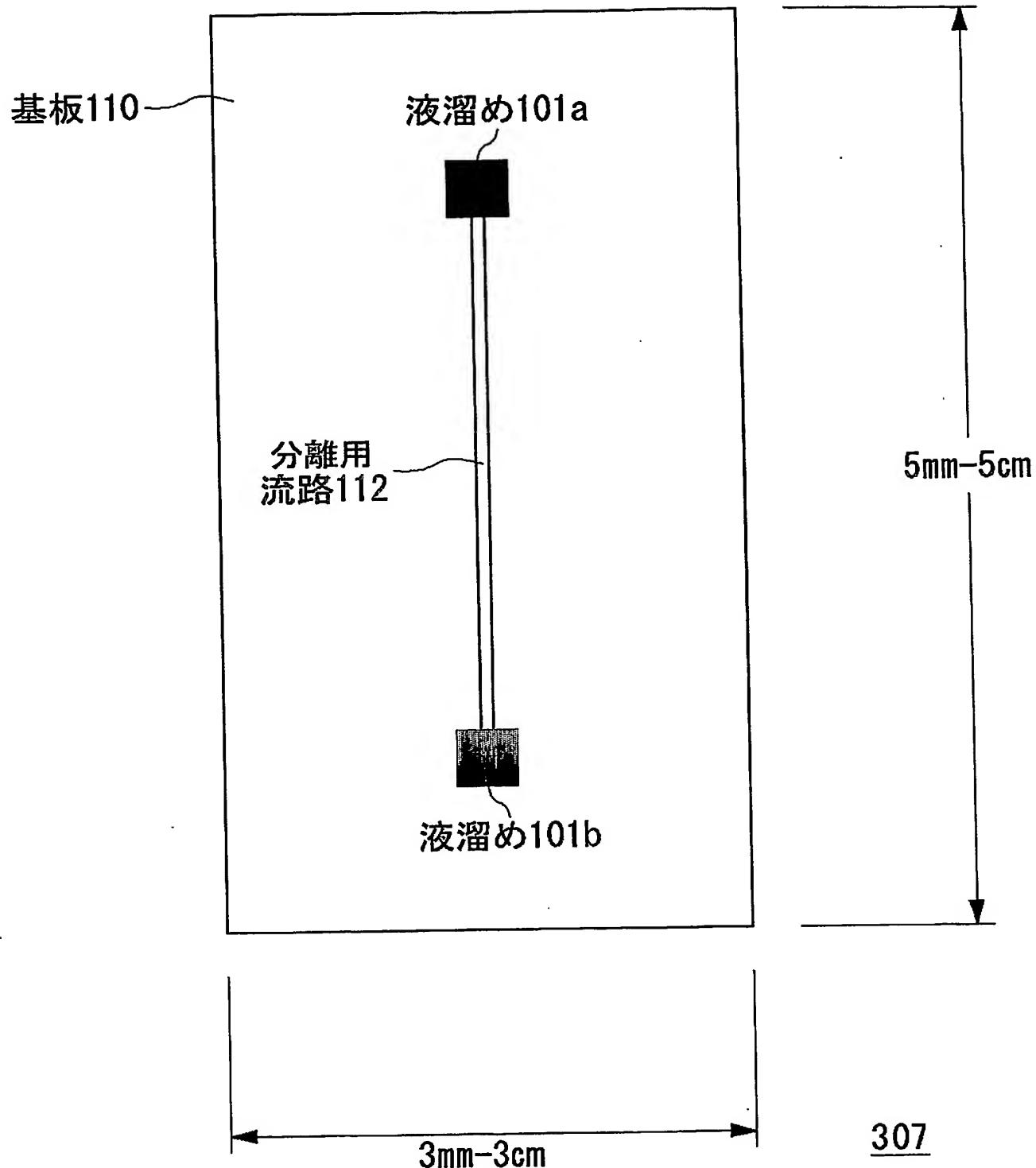


Fig.4

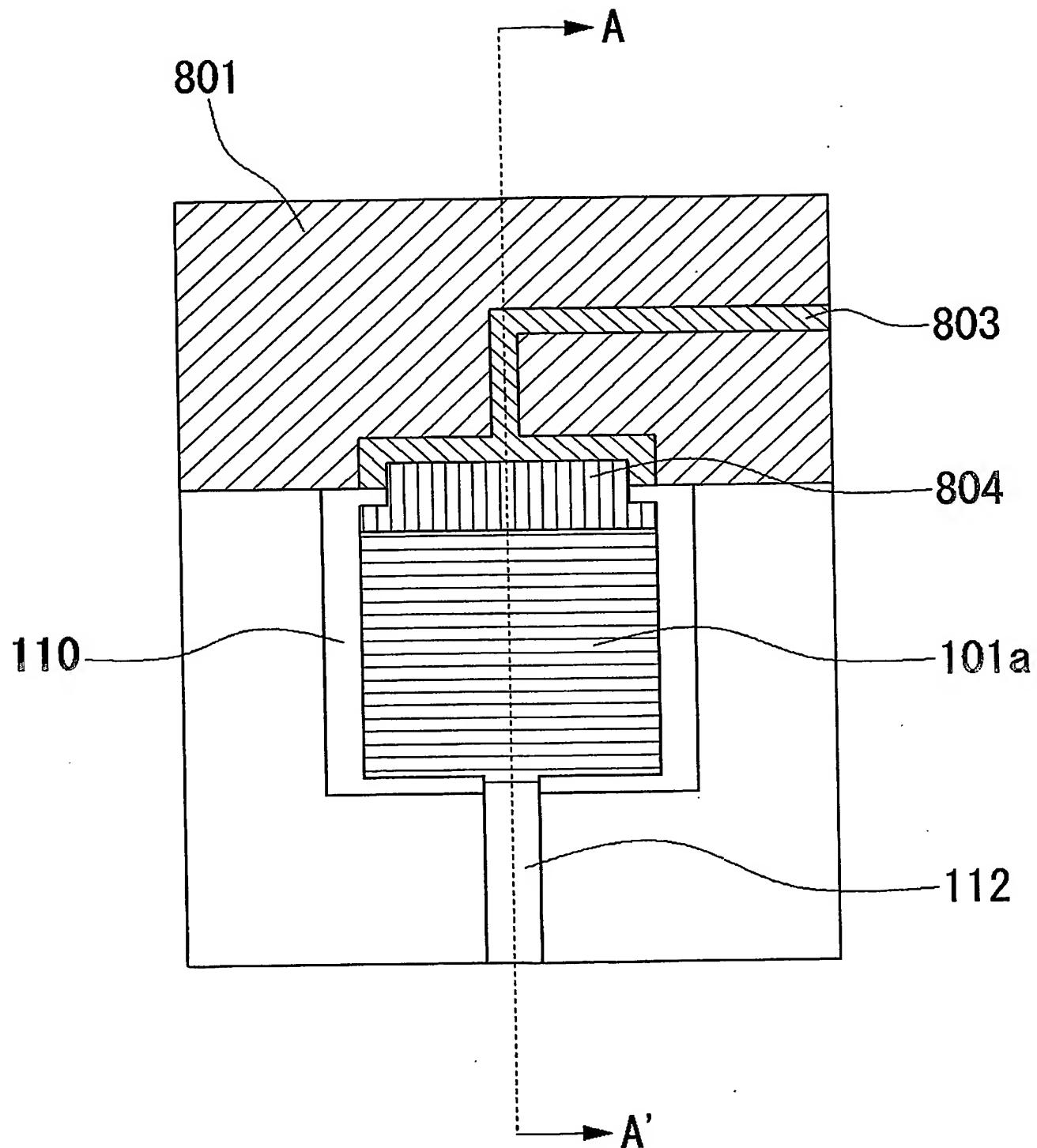


Fig.5

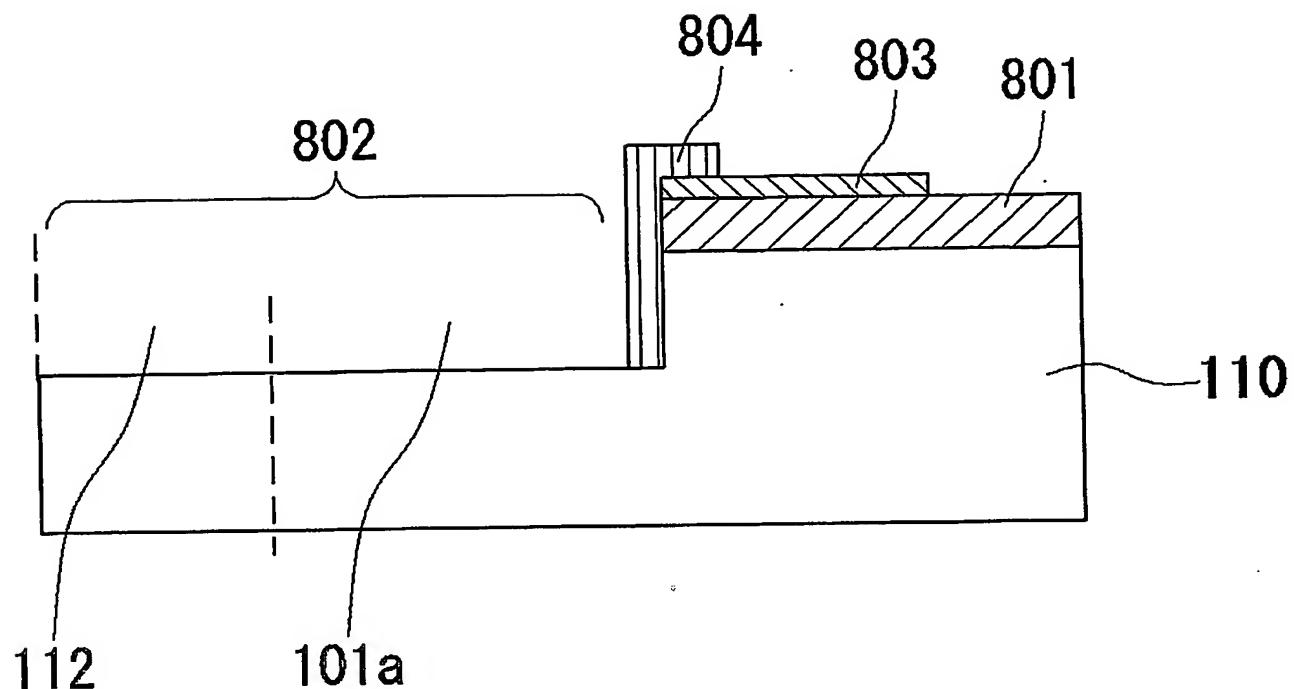
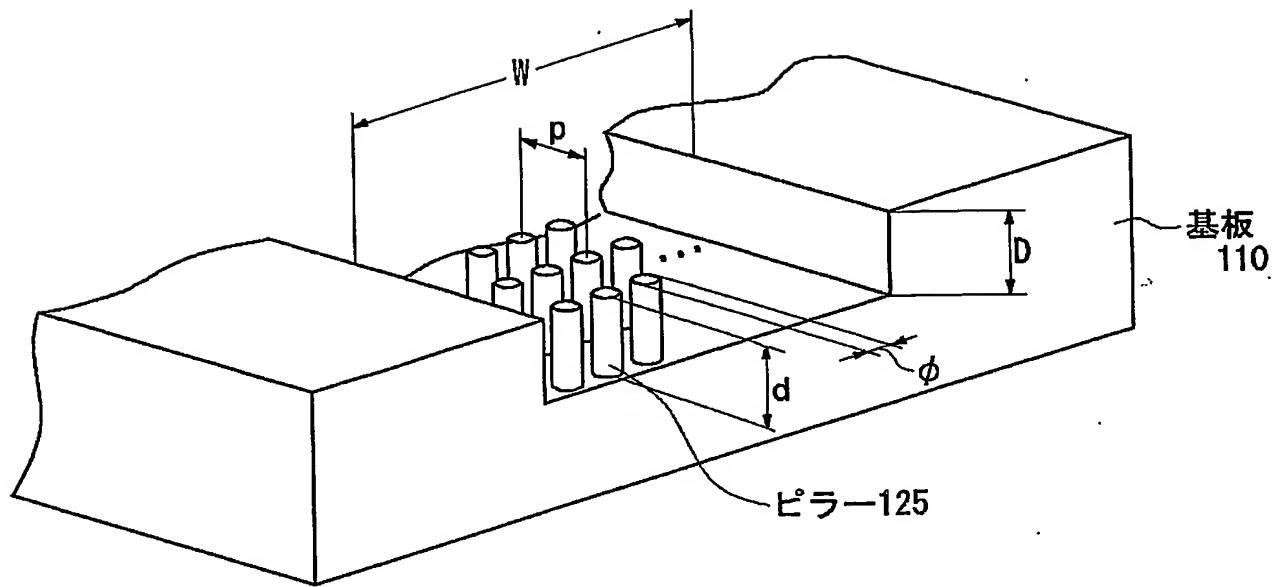


Fig.6



W	10 ~ 2000 $\mu\text{m}$
D	50nm ~ 3 $\mu\text{m}$
$\phi$	10 ~ 100nm
d	10nm ~ 3 $\mu\text{m}$
p	1nm ~ 10 $\mu\text{m}$

Fig.7

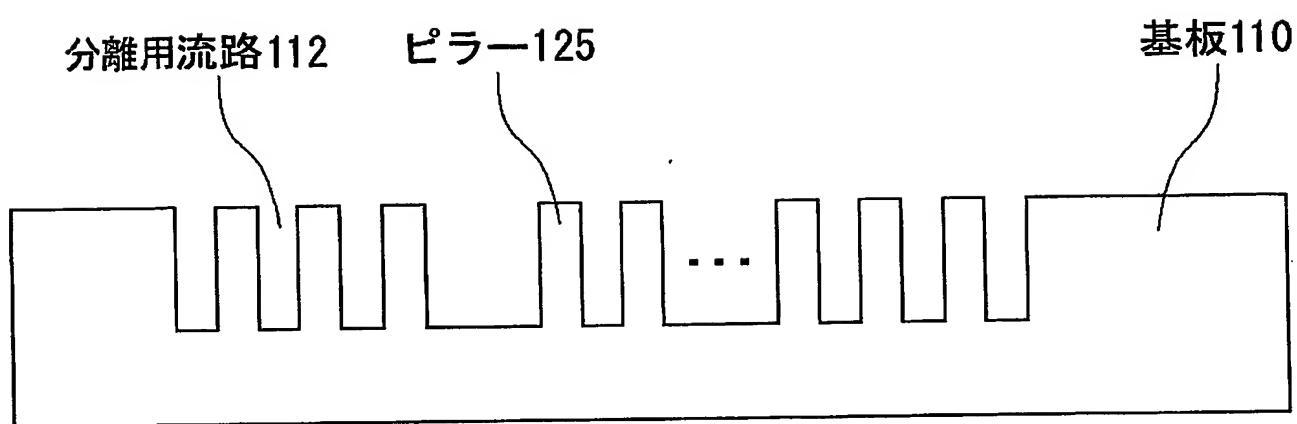


Fig.8

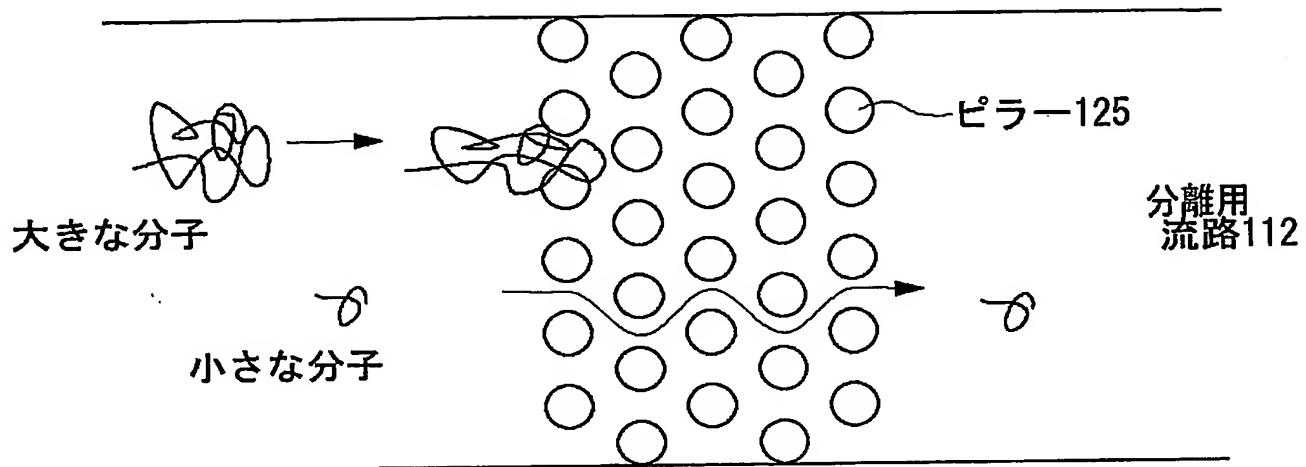
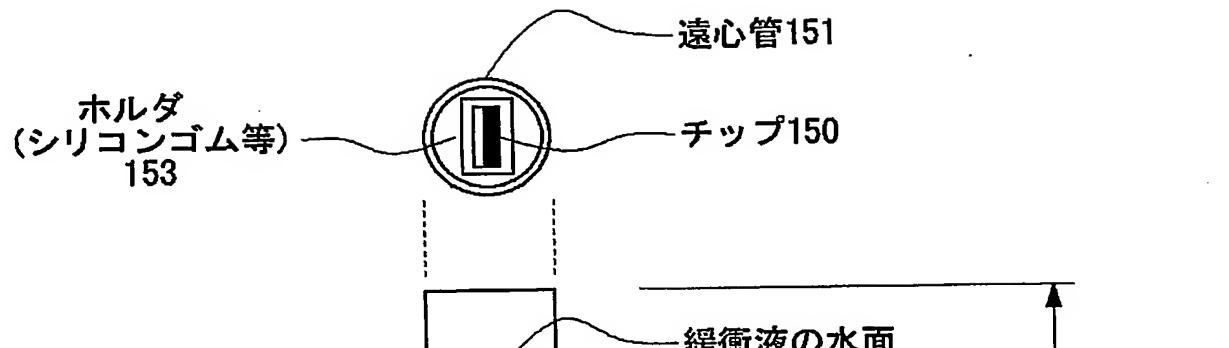


Fig.9

## 平面図



## 立面図

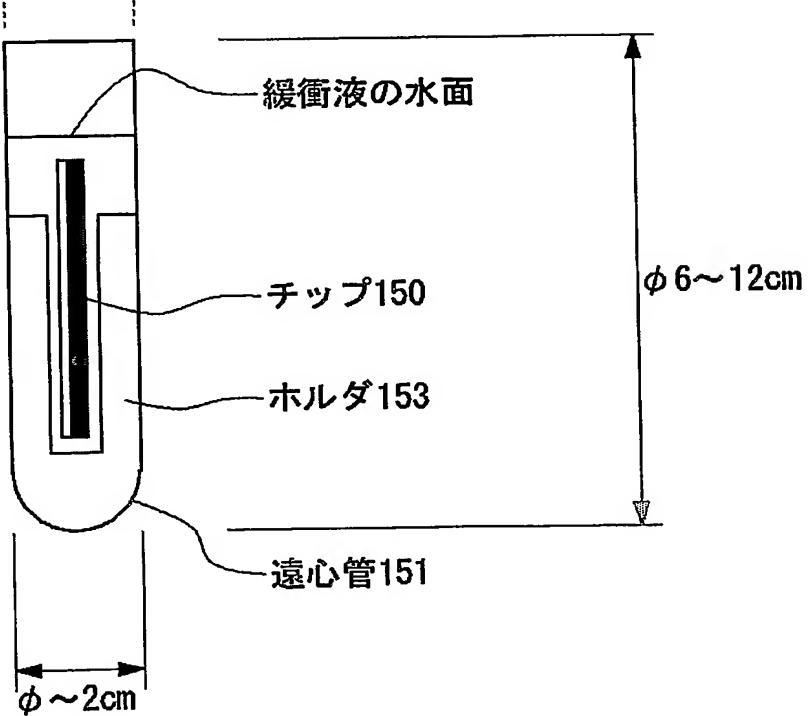


Fig.10

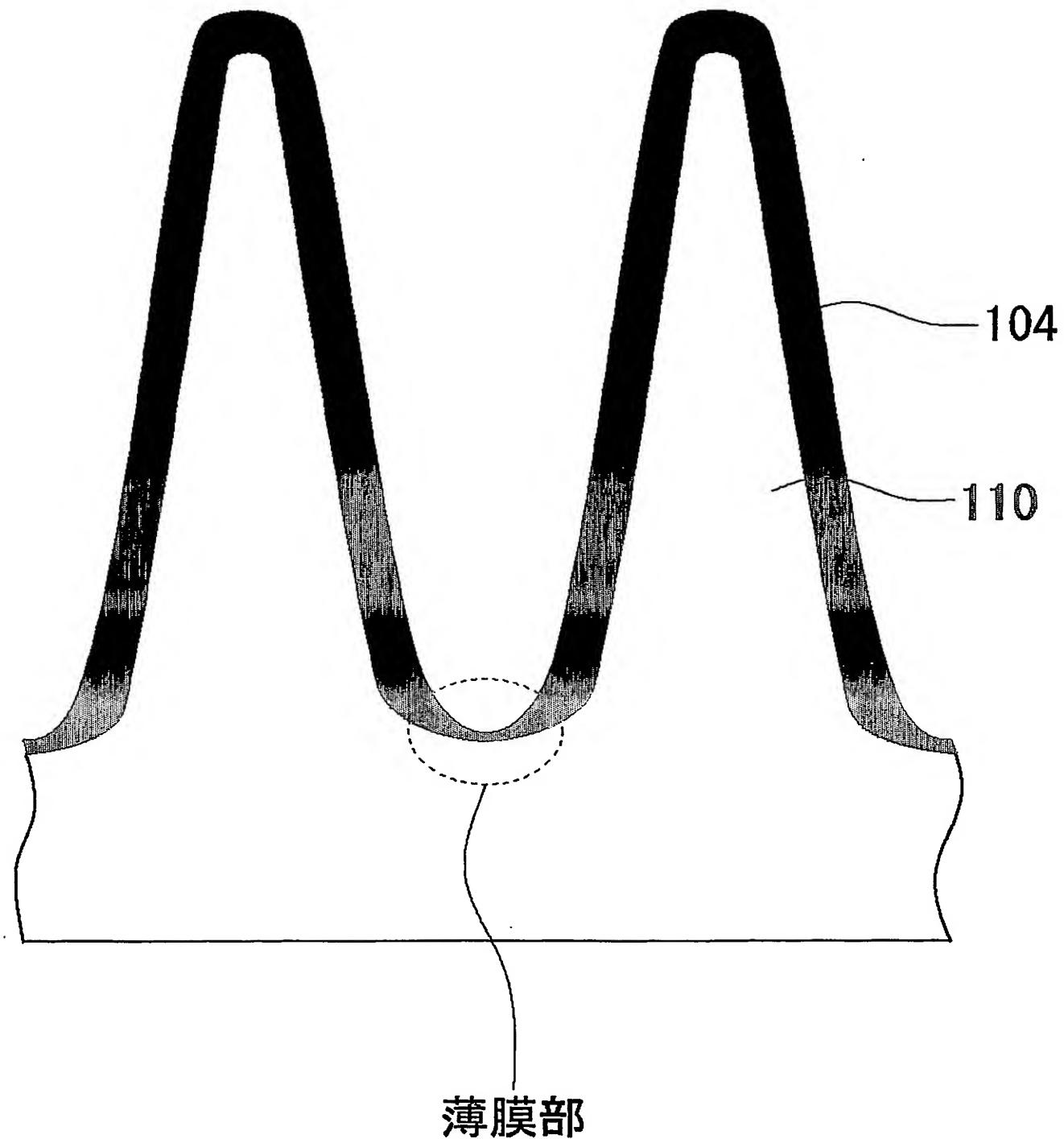


Fig.11

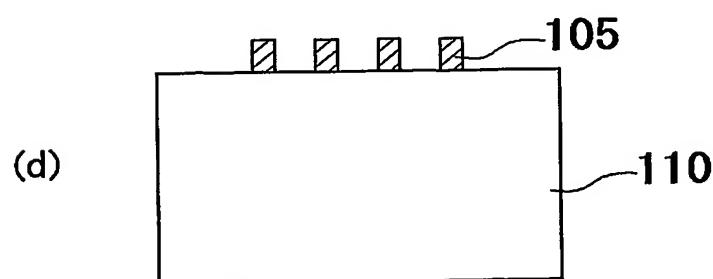
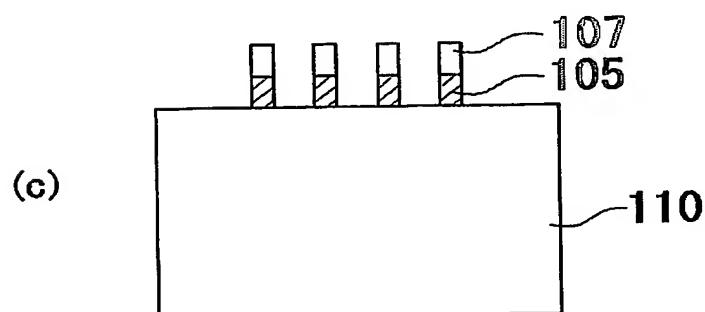
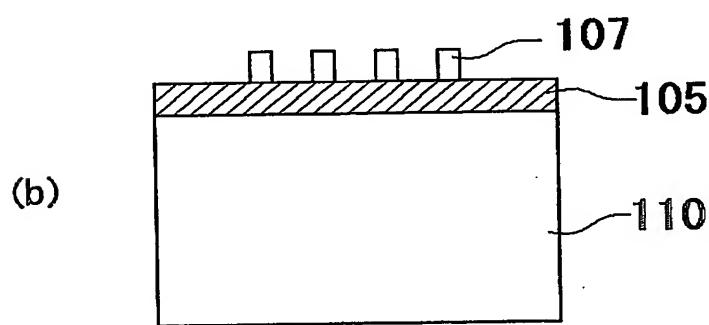
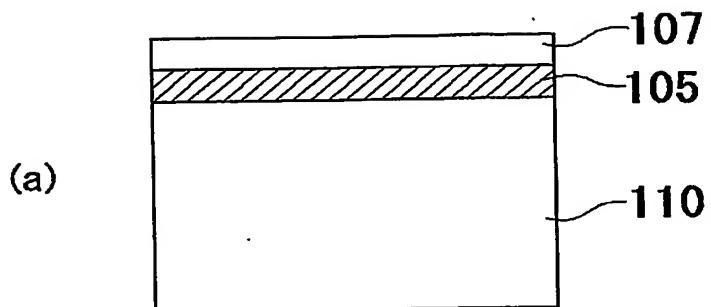


Fig.12

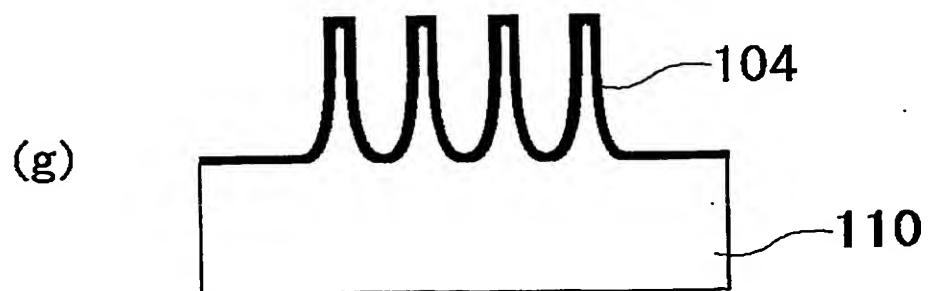
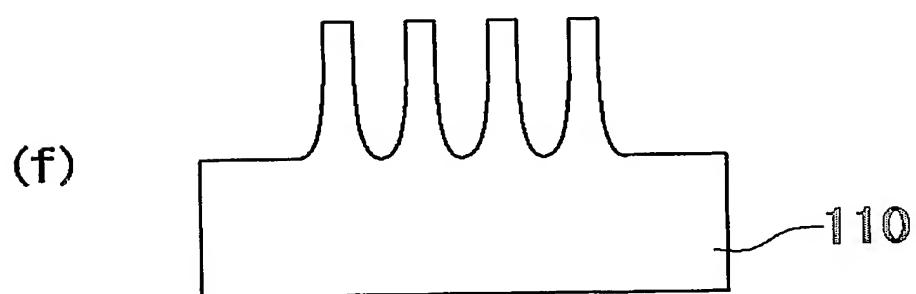
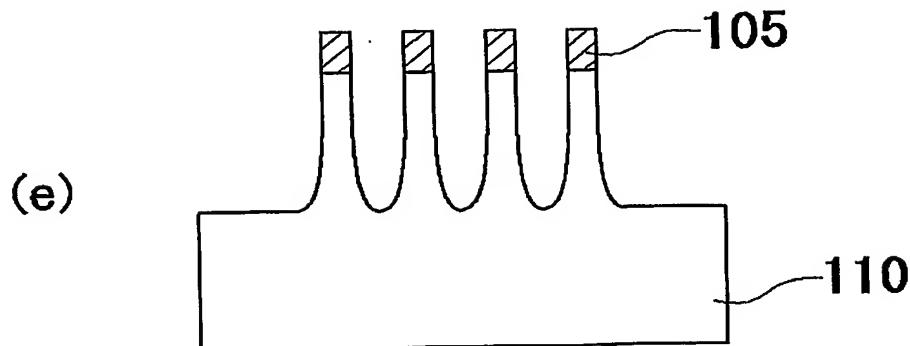
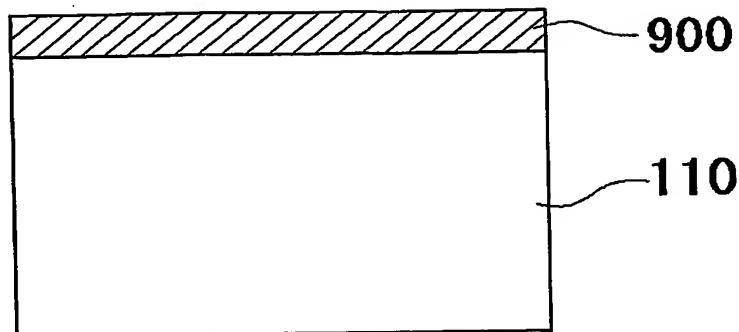
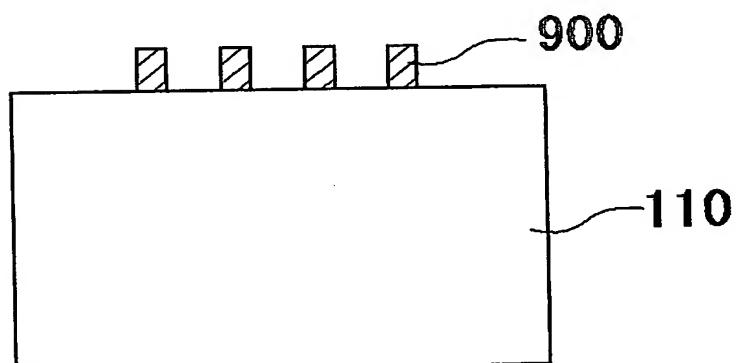


Fig.13

(a)



(b)



(c)

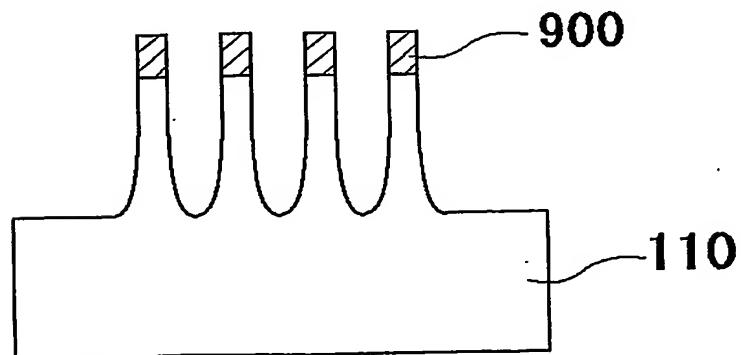


Fig.14

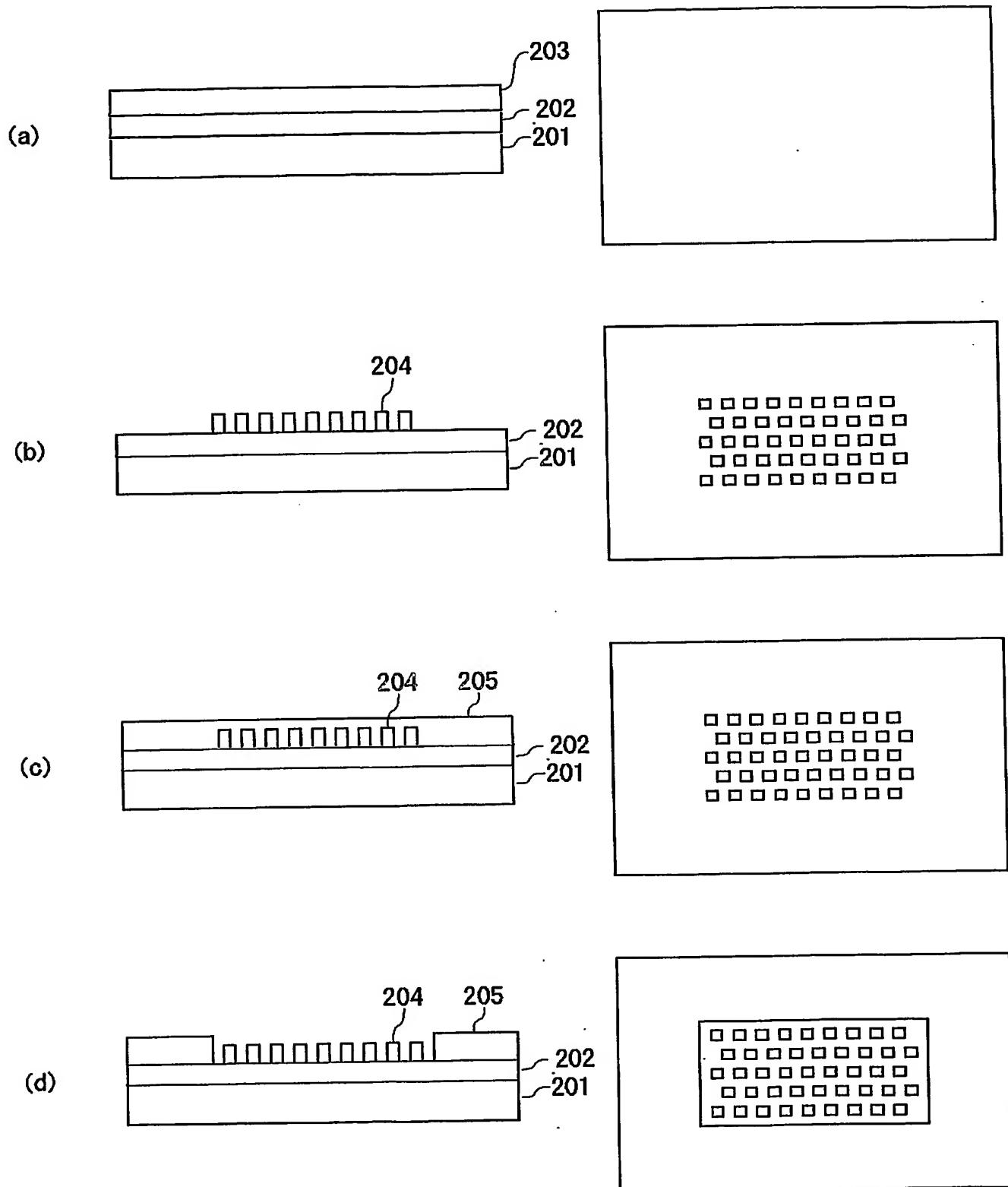


Fig.15

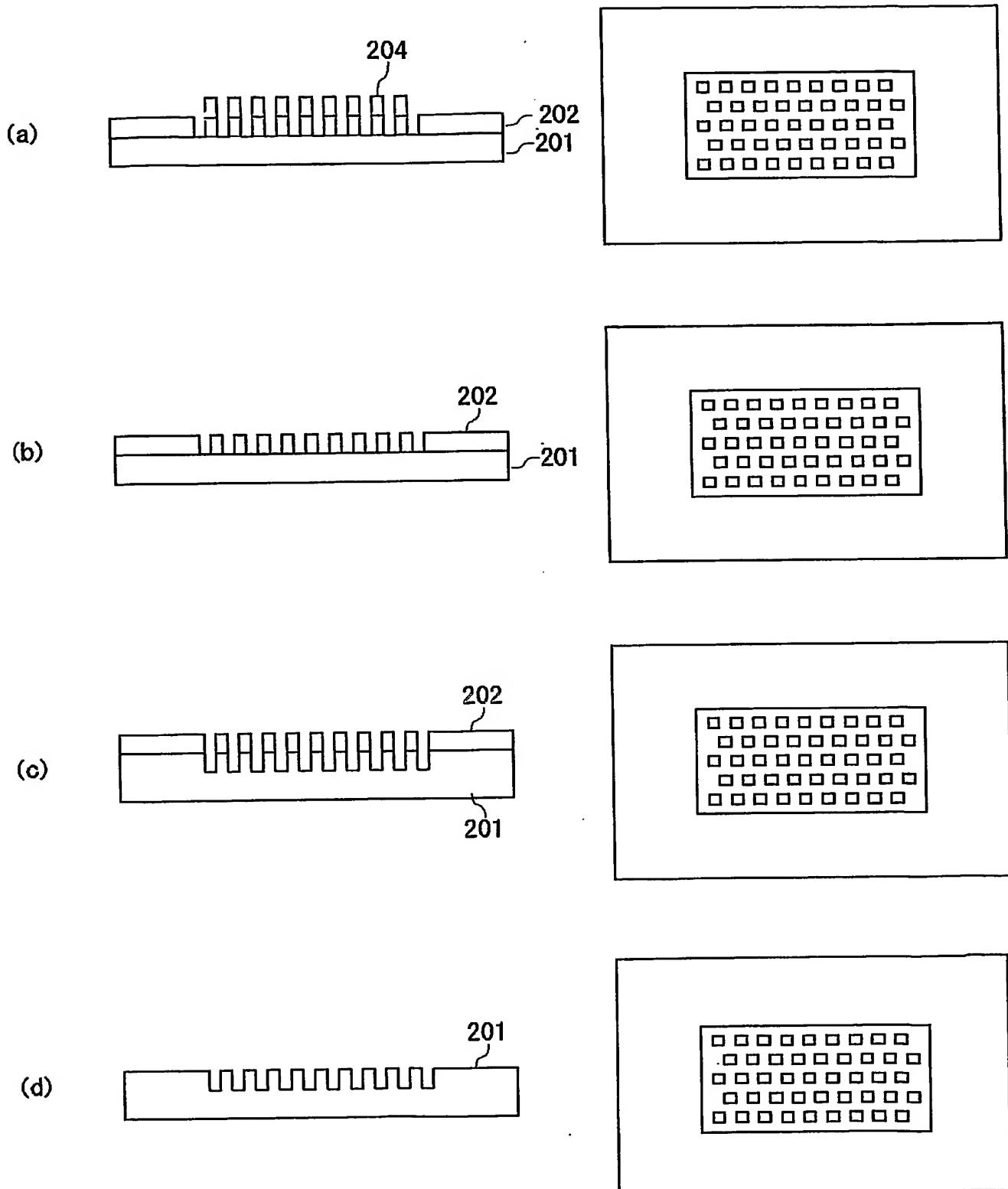


Fig.16

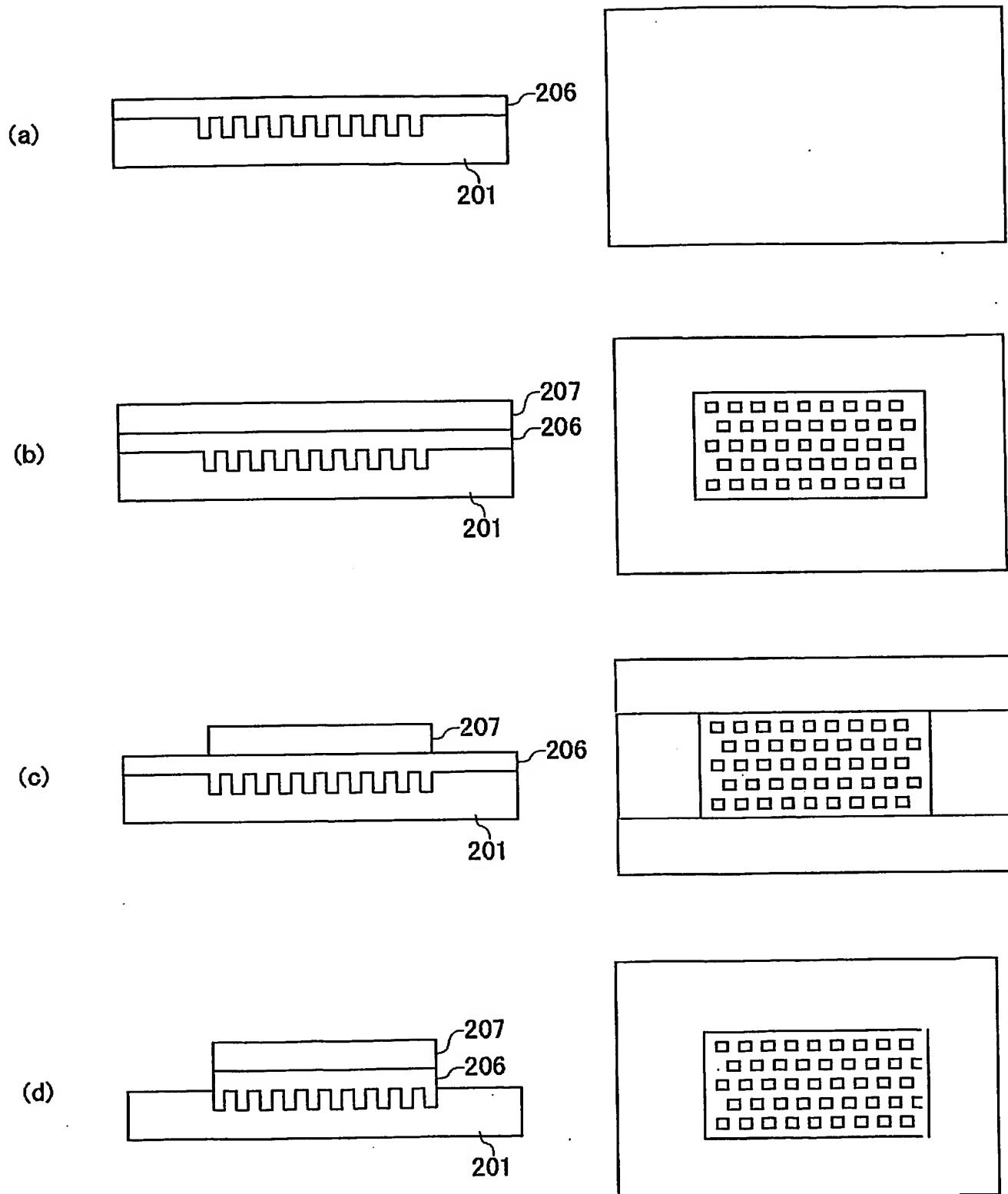
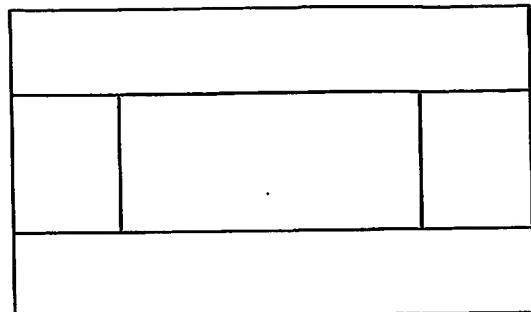
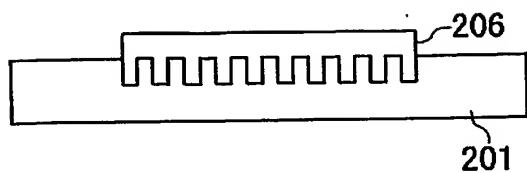
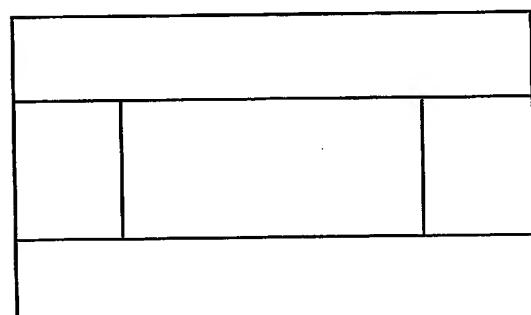
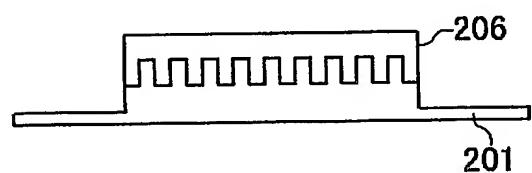


Fig.17

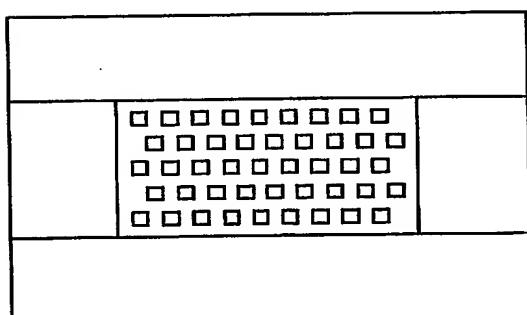
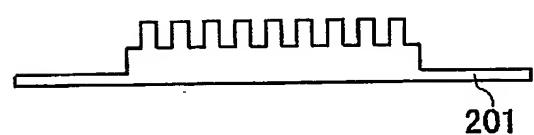
(a)



(b)



(c)



(d)

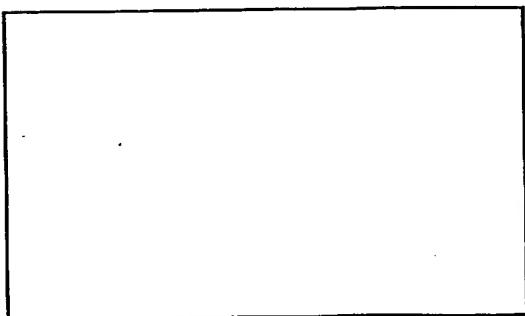
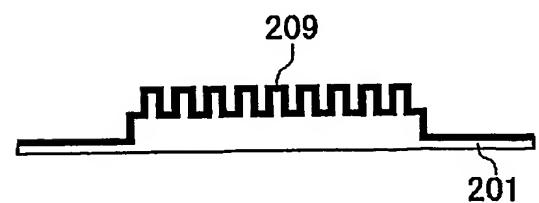


Fig.18

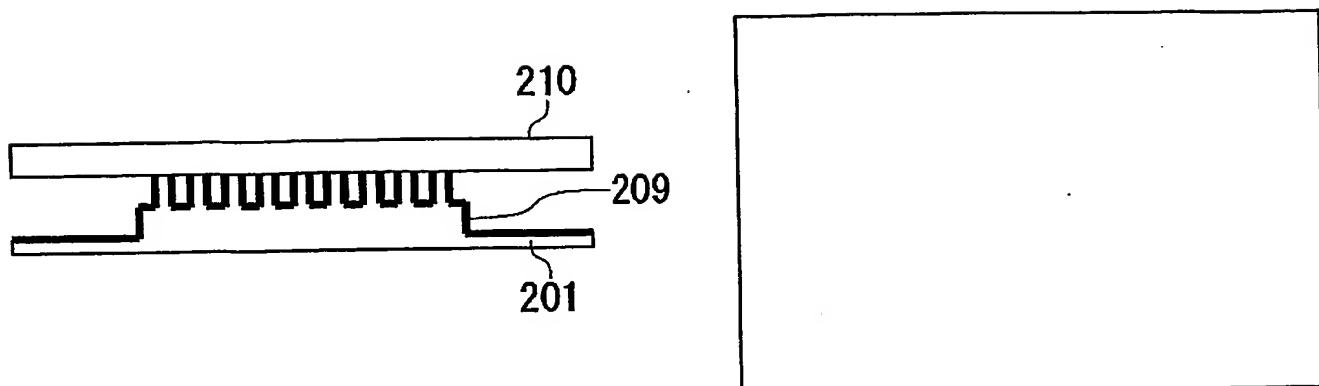


Fig.19

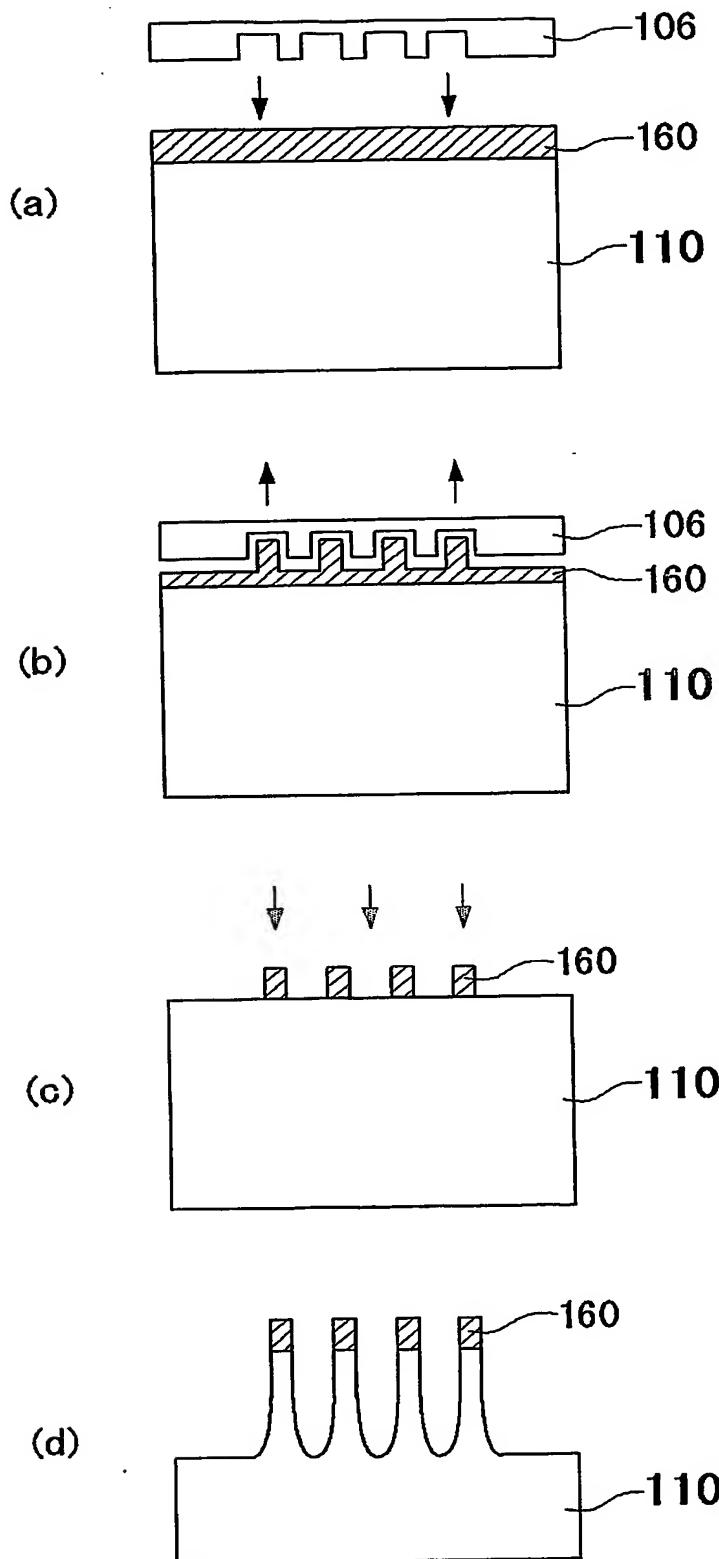
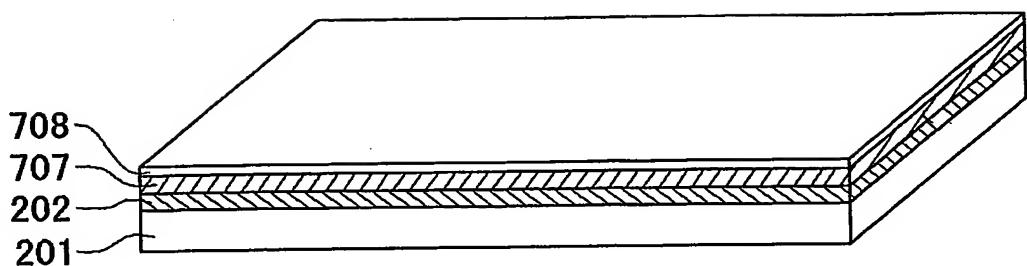
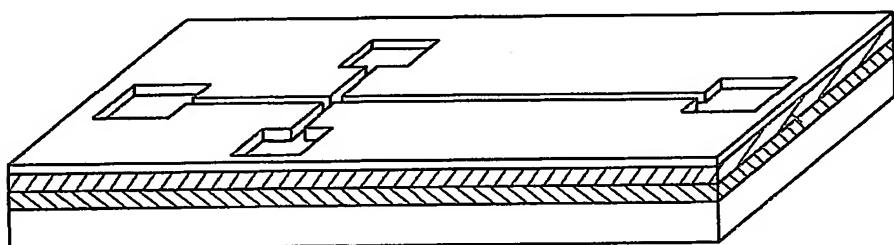


Fig.20

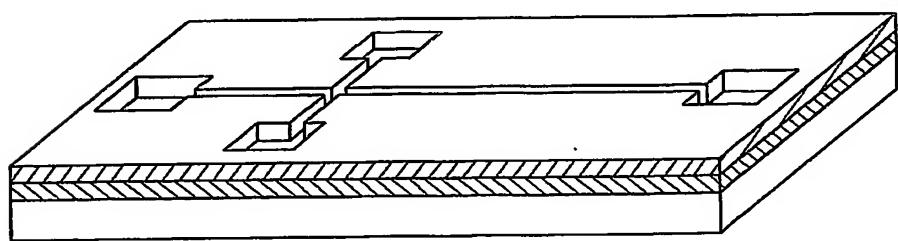
(a)



(b)



(c)



(d)

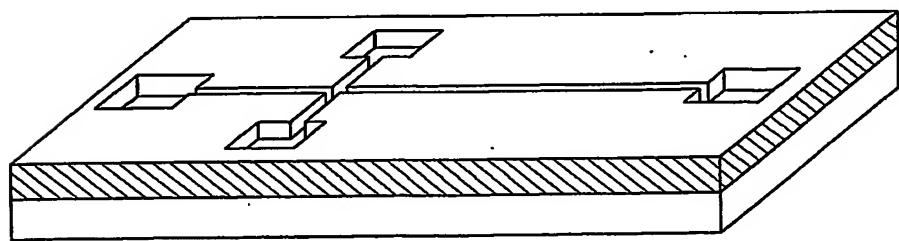


Fig.21

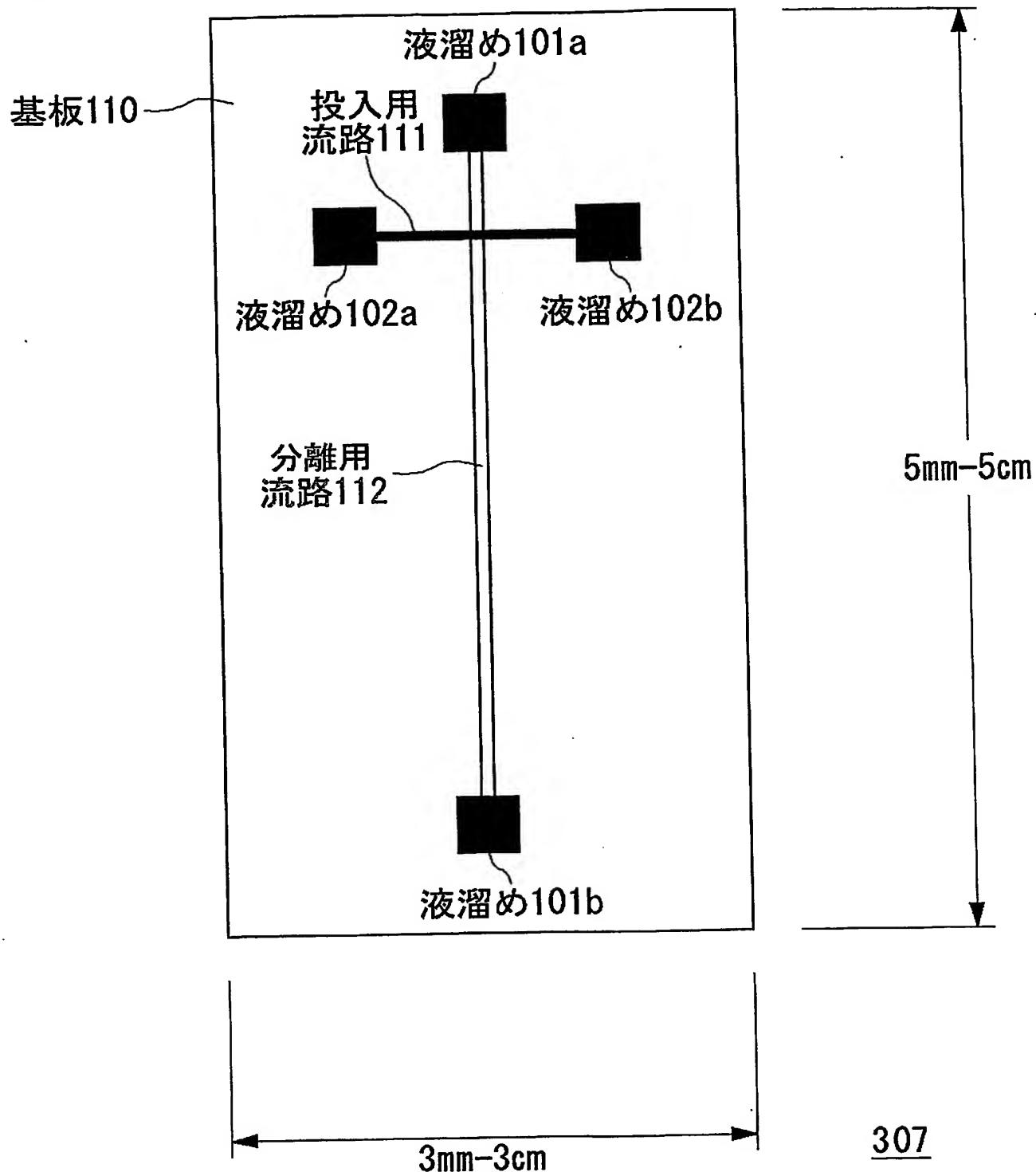


Fig.22

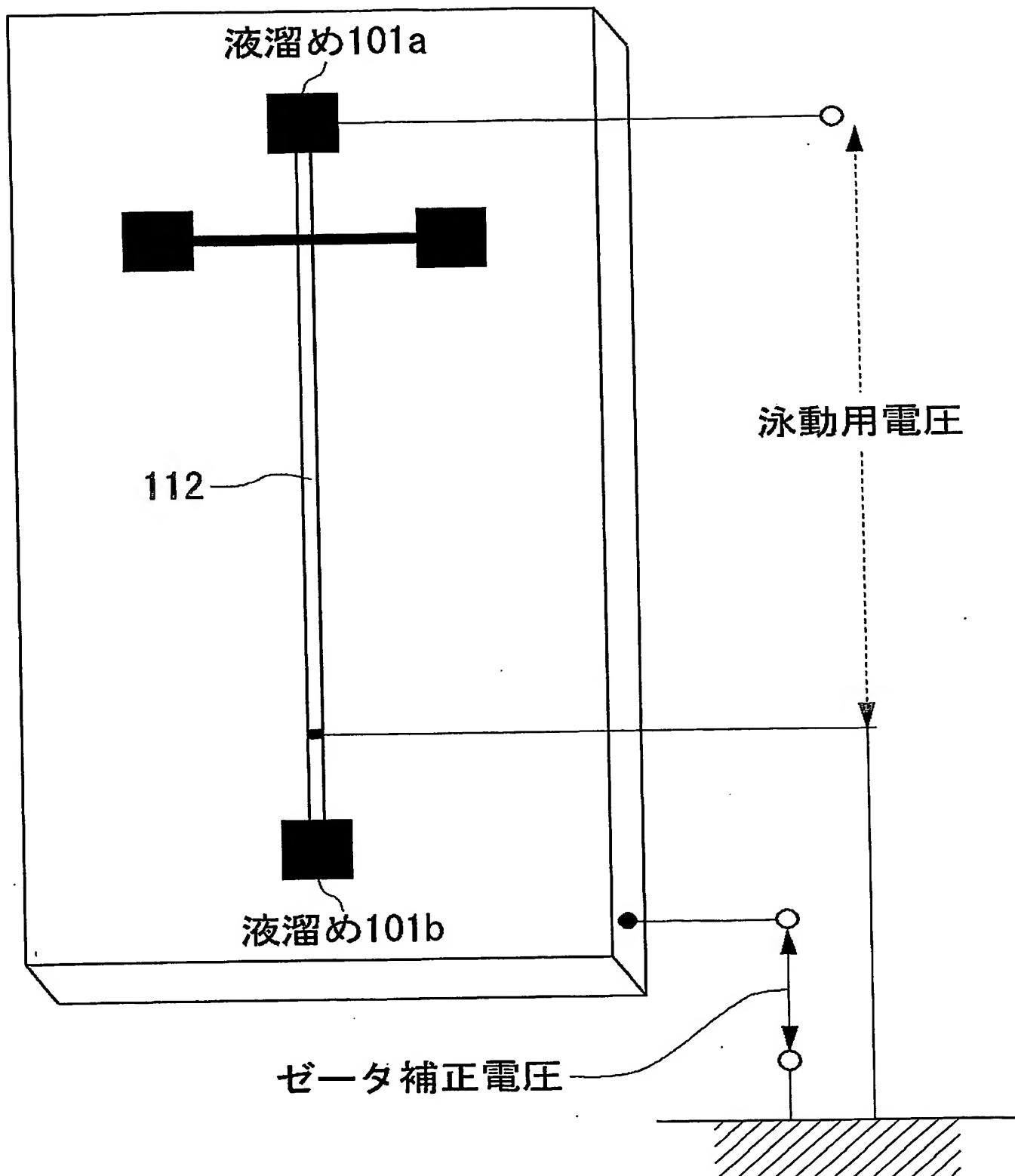


Fig.23

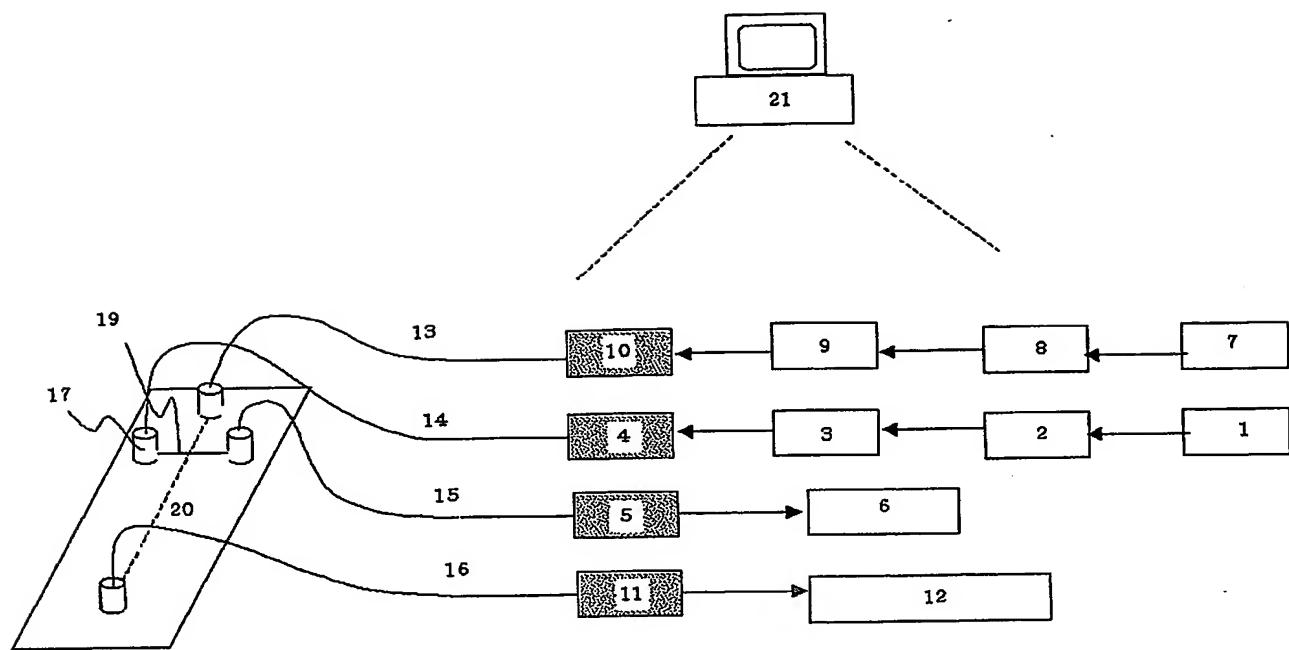


Fig.24

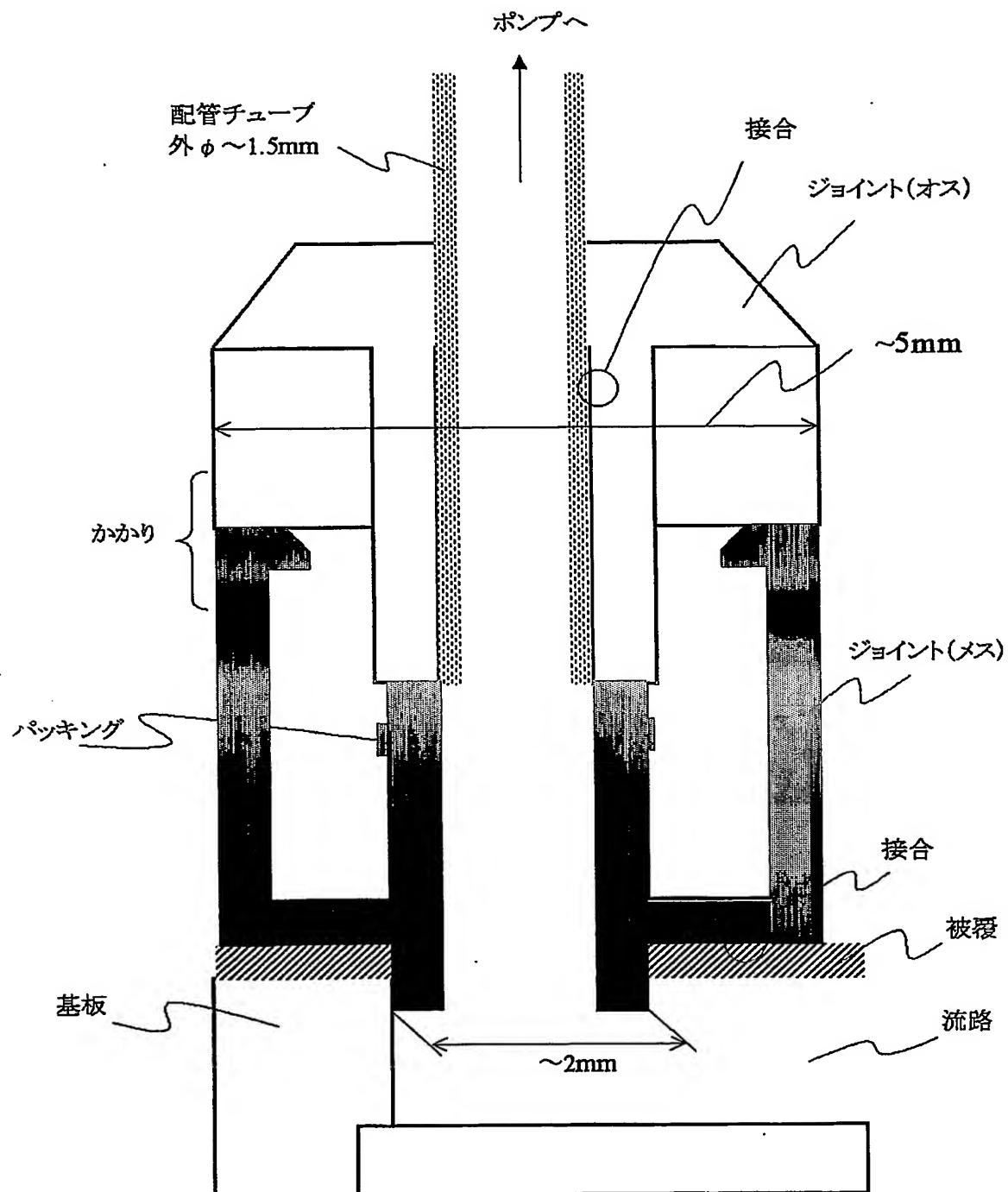


Fig.25

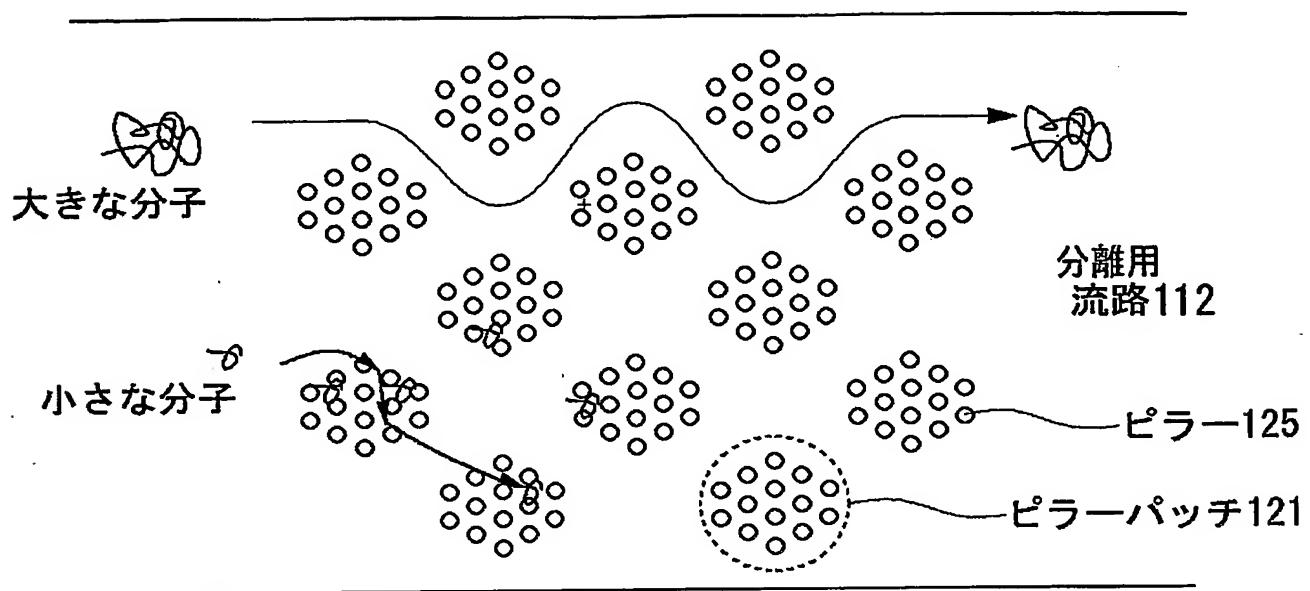
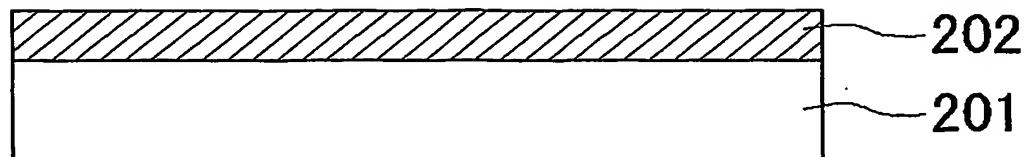
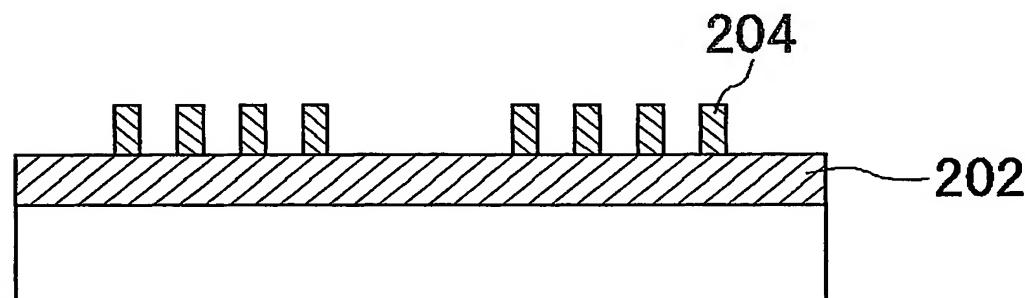


Fig.26

(a)



(b)



(c)

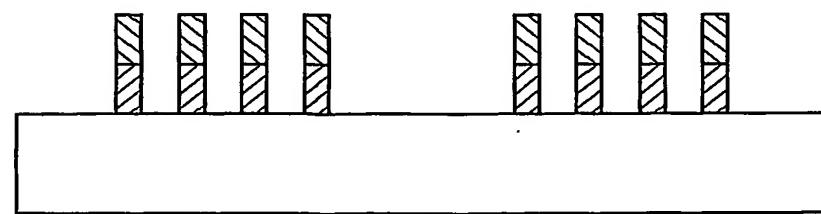
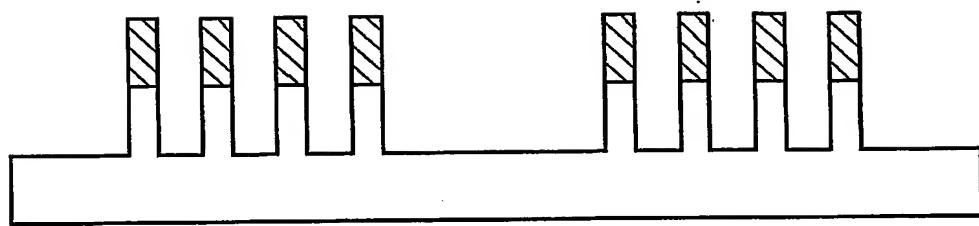


Fig.27

(d)



(e)

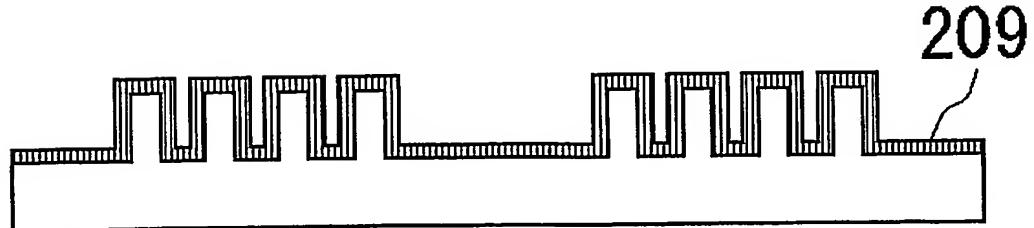
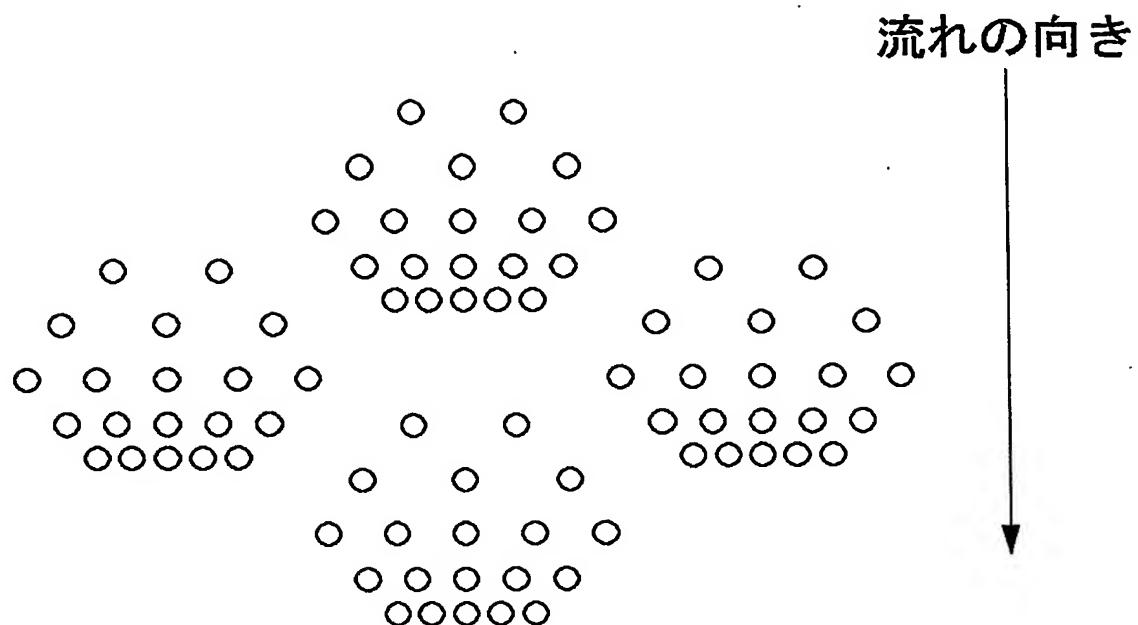


Fig.28

(a)



(b)

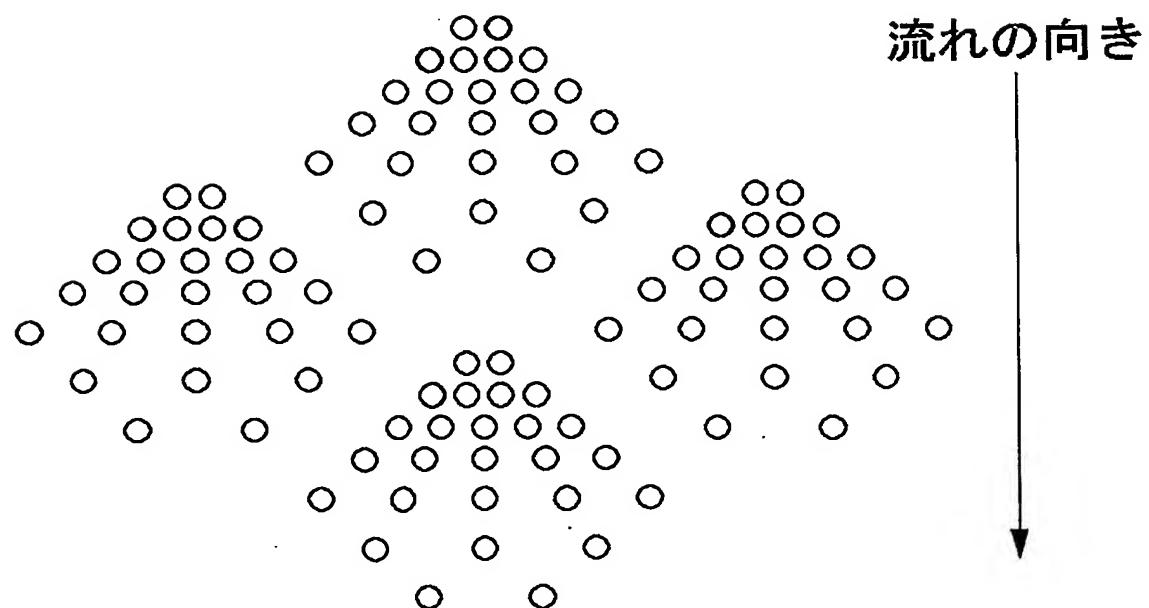


Fig.29

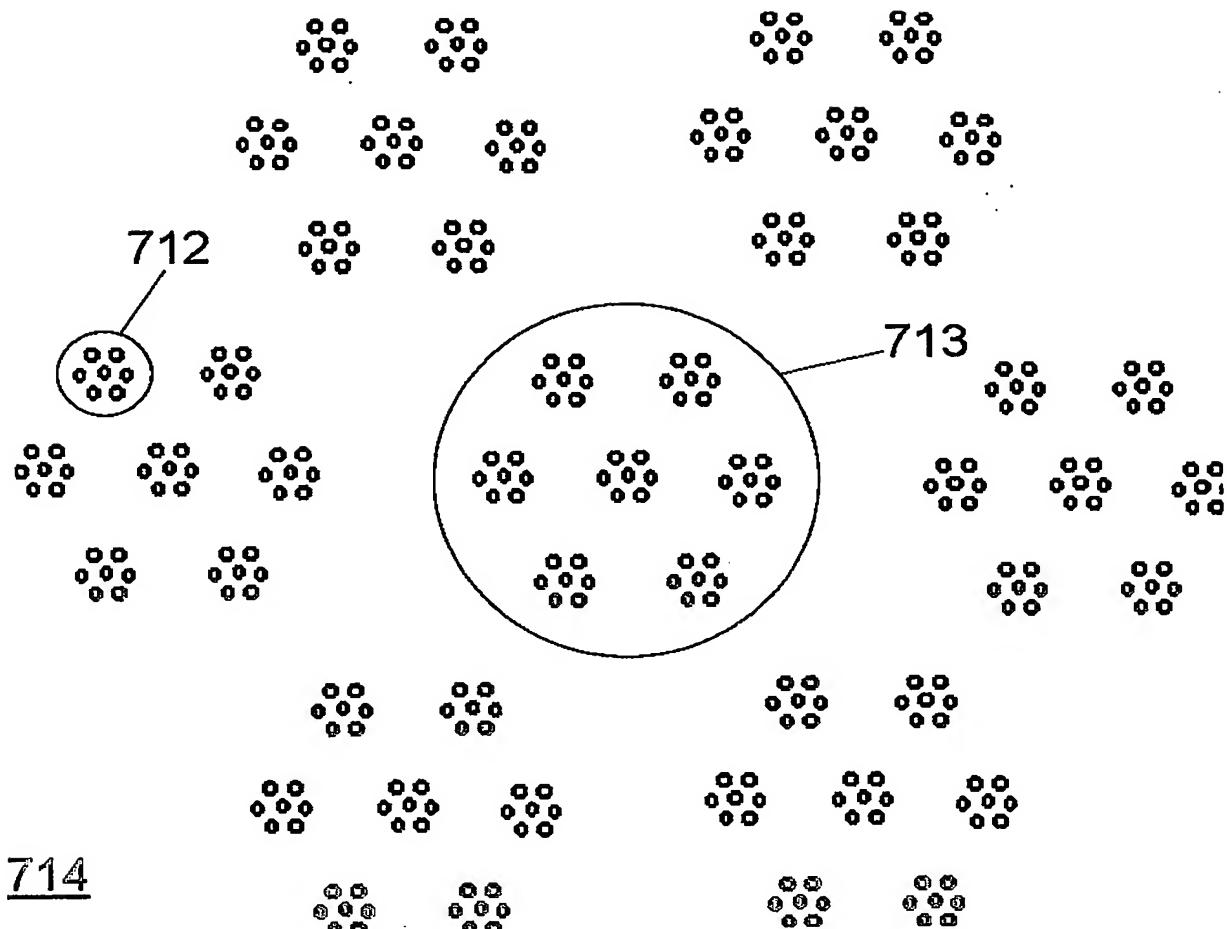


Fig.30

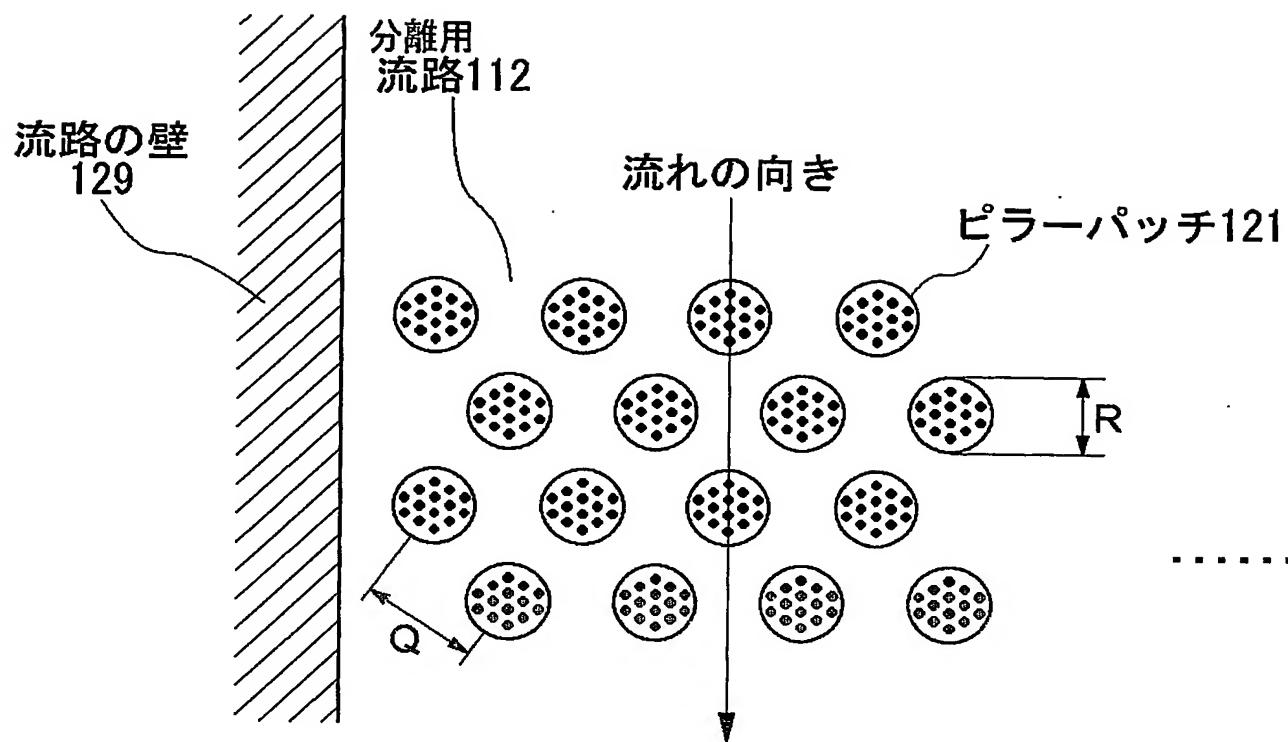


Fig.31

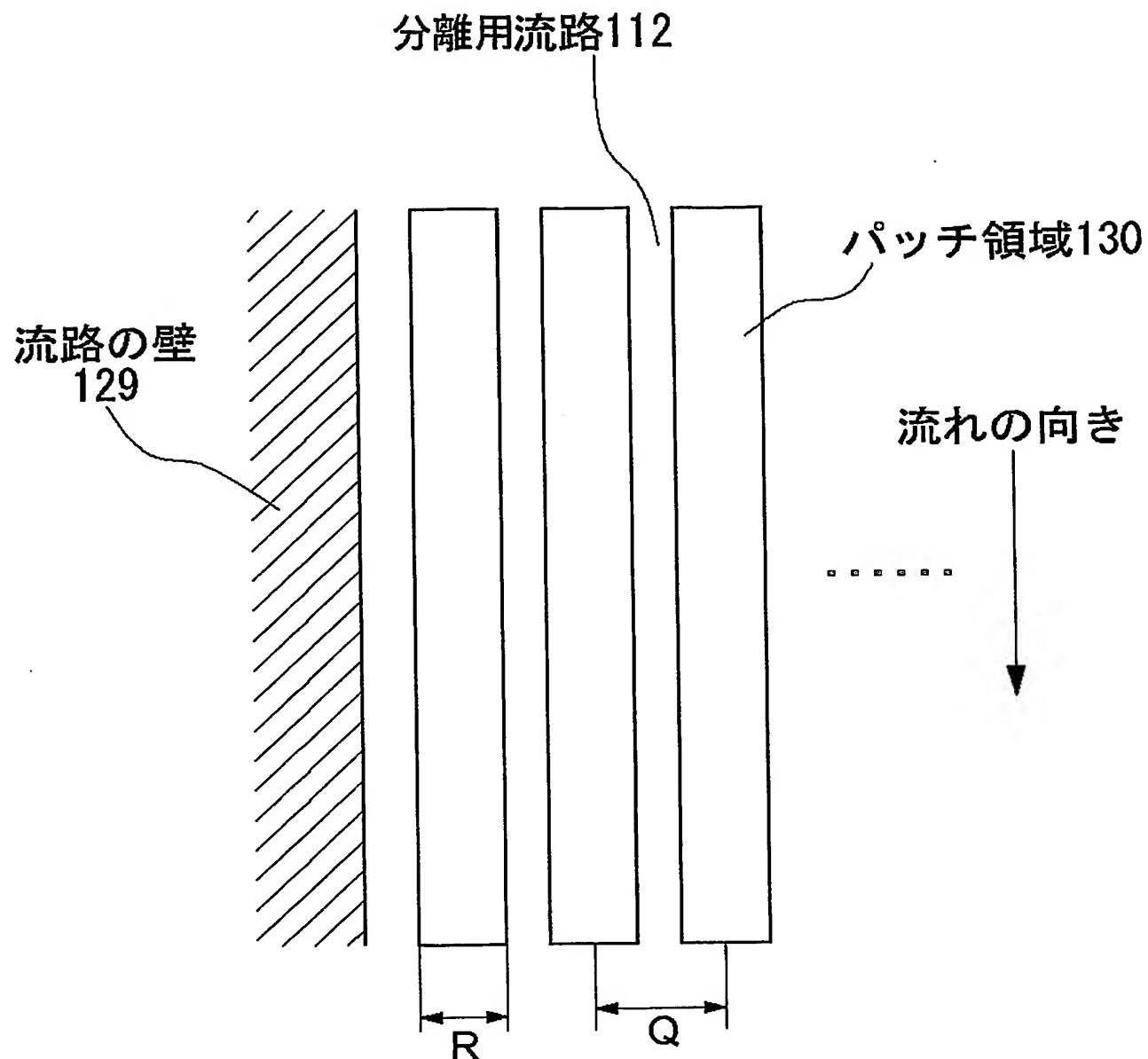


Fig.32

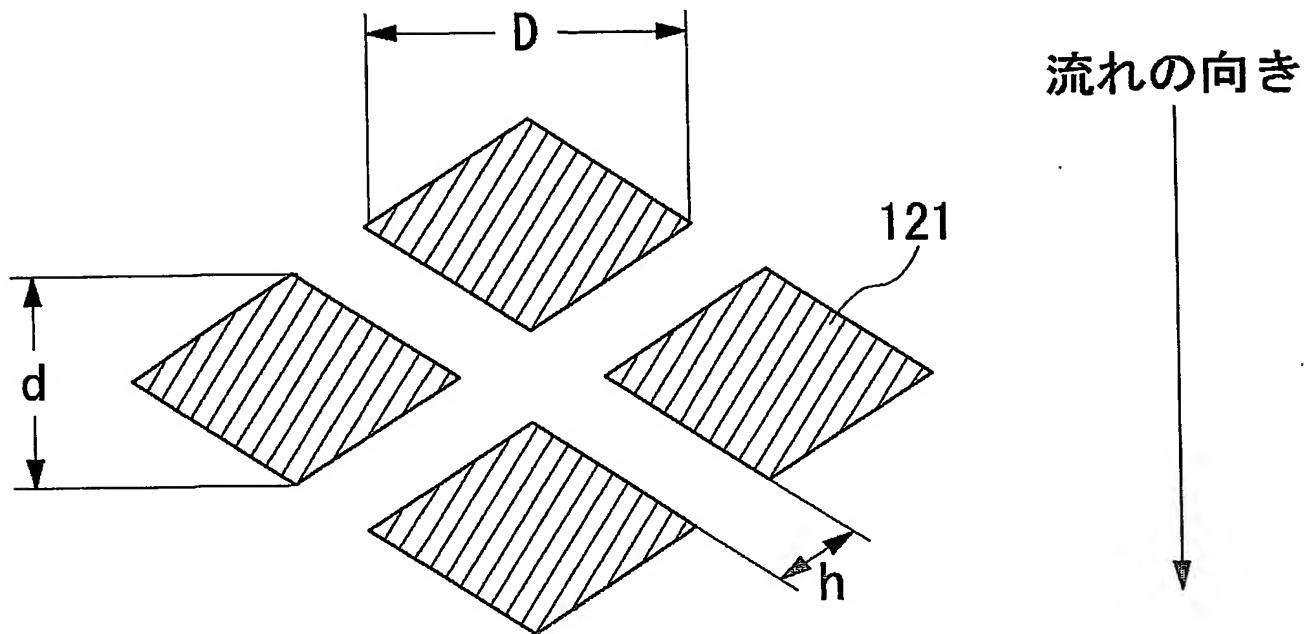
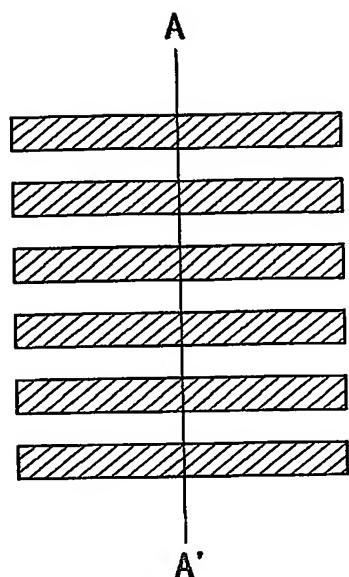
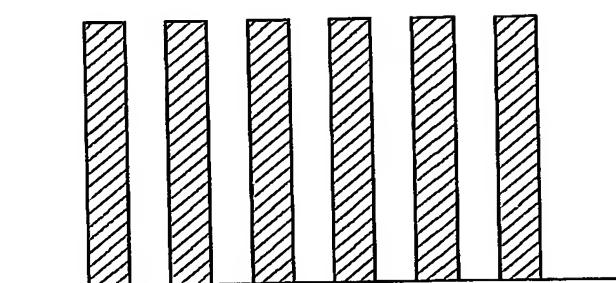


Fig.33

(a)



(b)



(c)

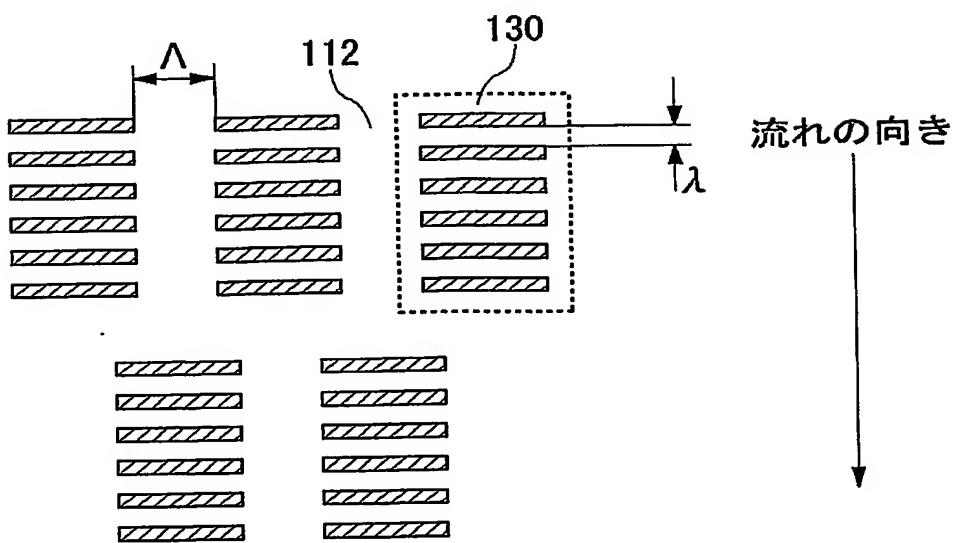
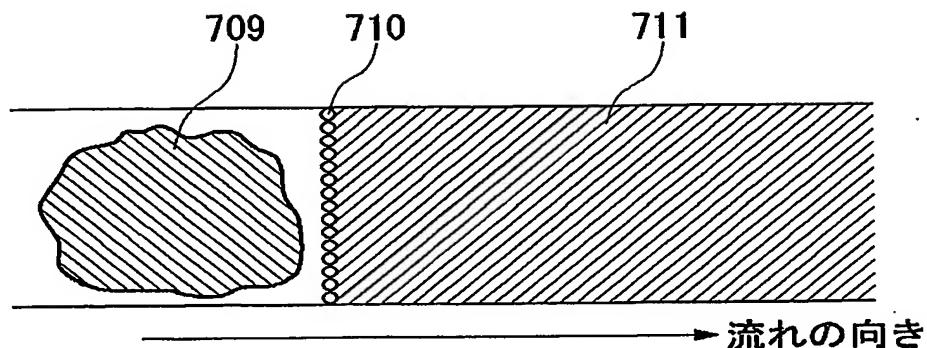
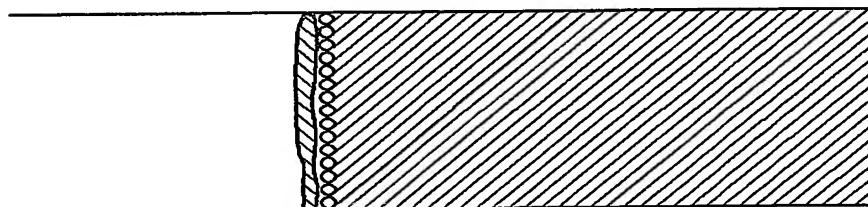


Fig.34

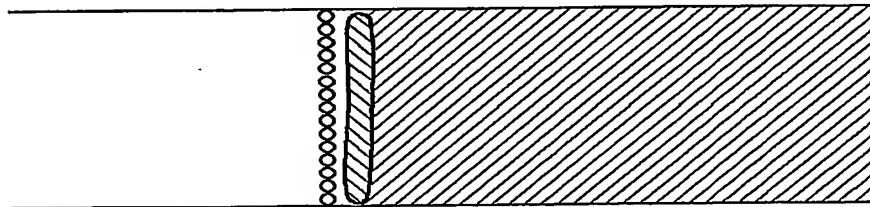
(a)



(b)



(c)



(d)

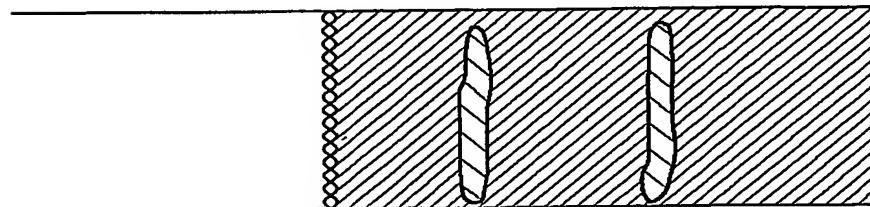


Fig.35

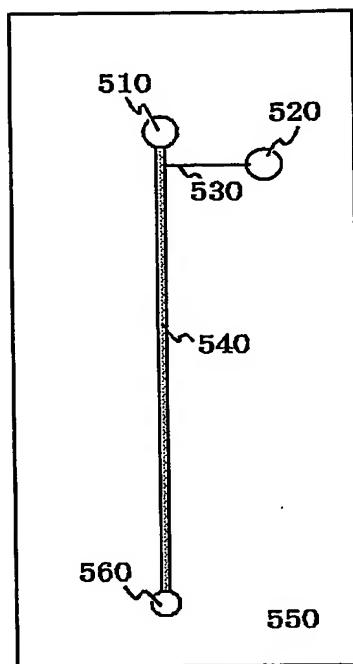


Fig.36

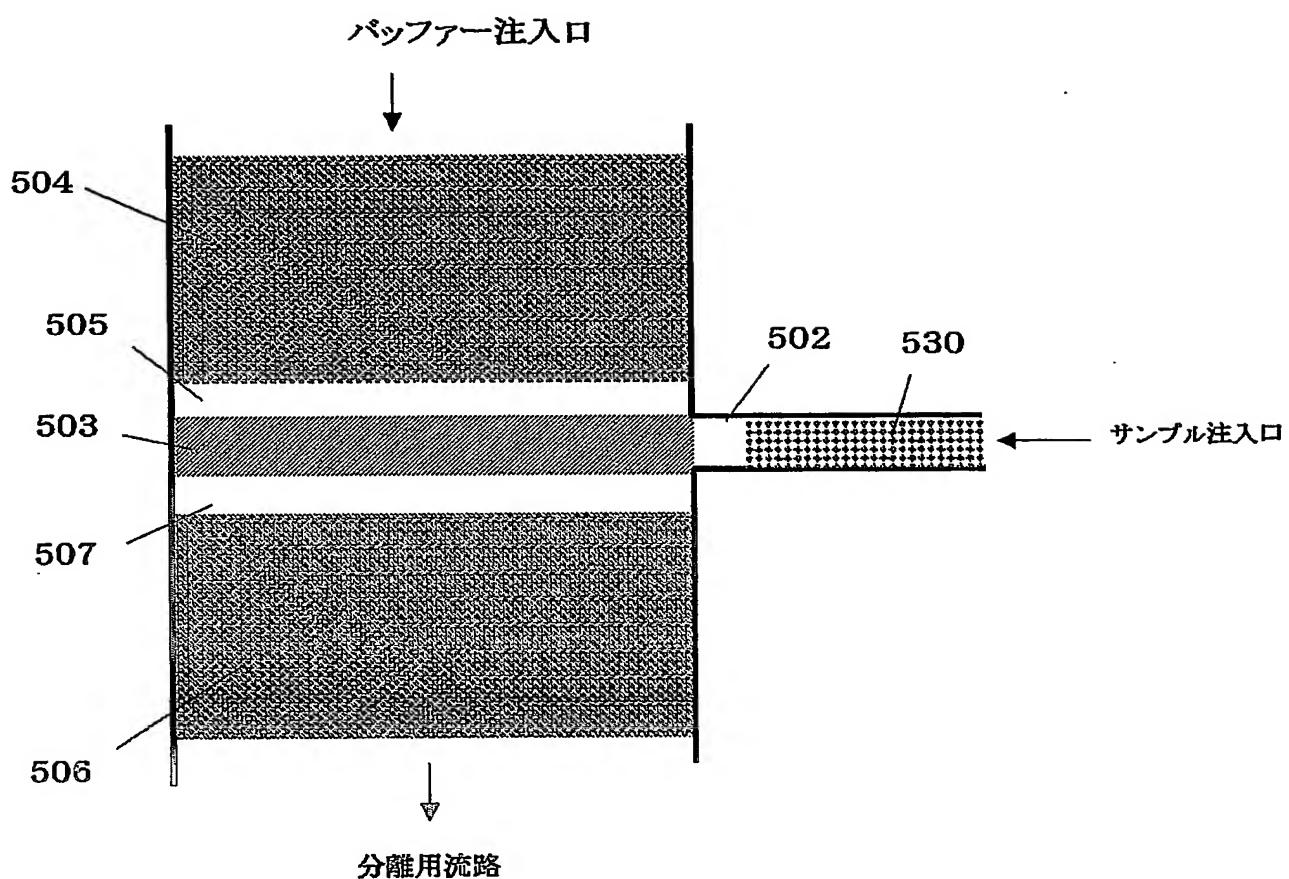


Fig.37

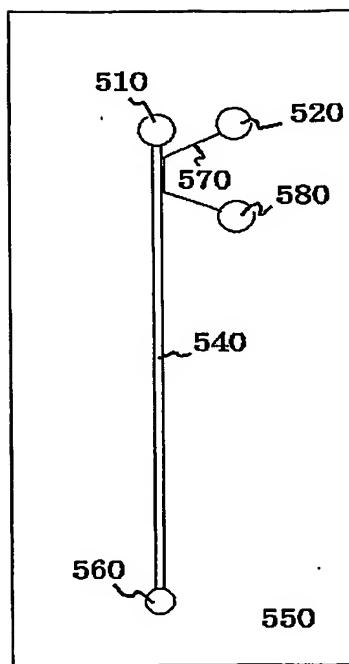


Fig.38

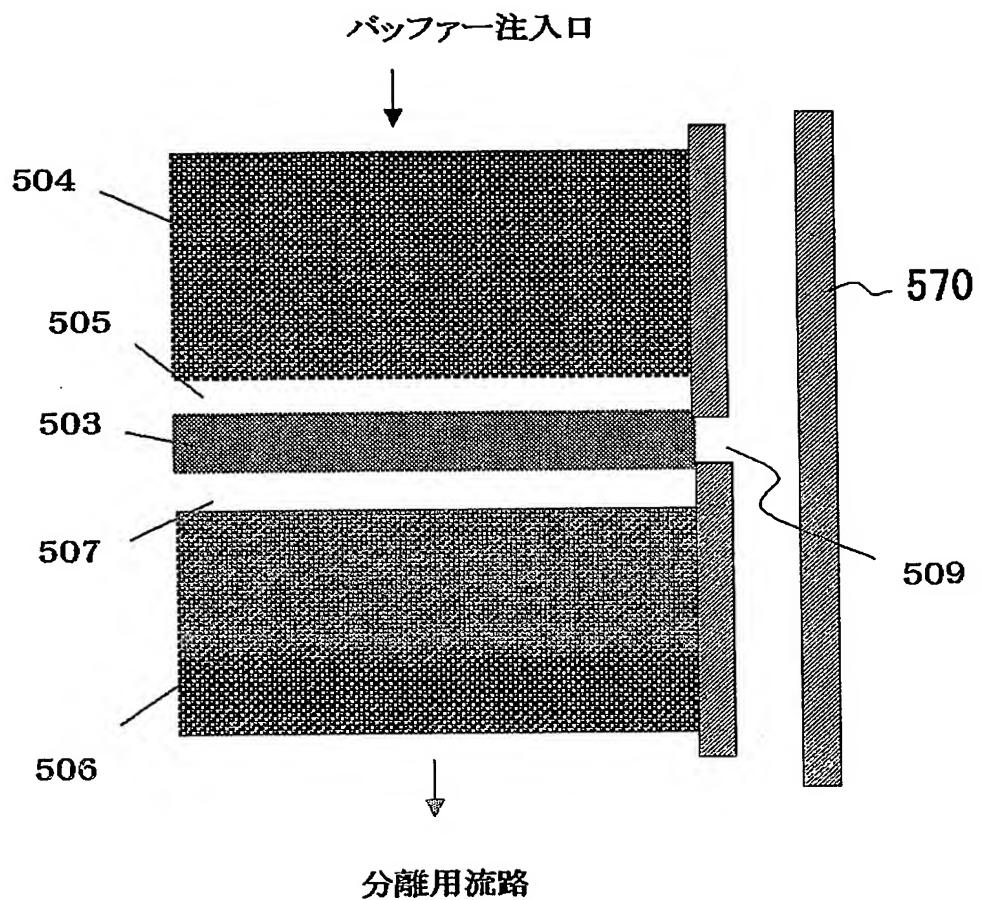


Fig.39

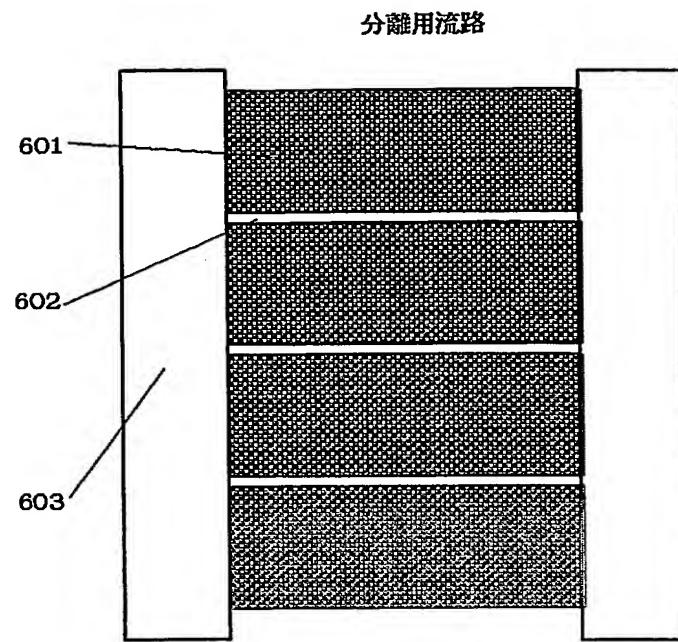


Fig.40

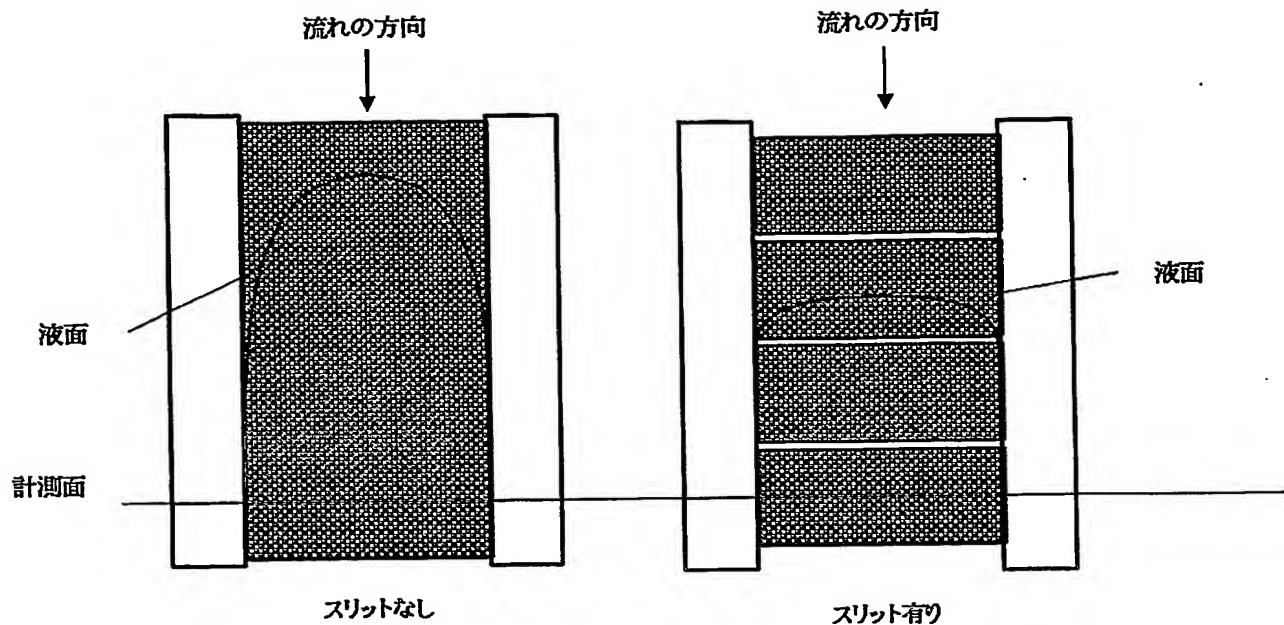


Fig.41

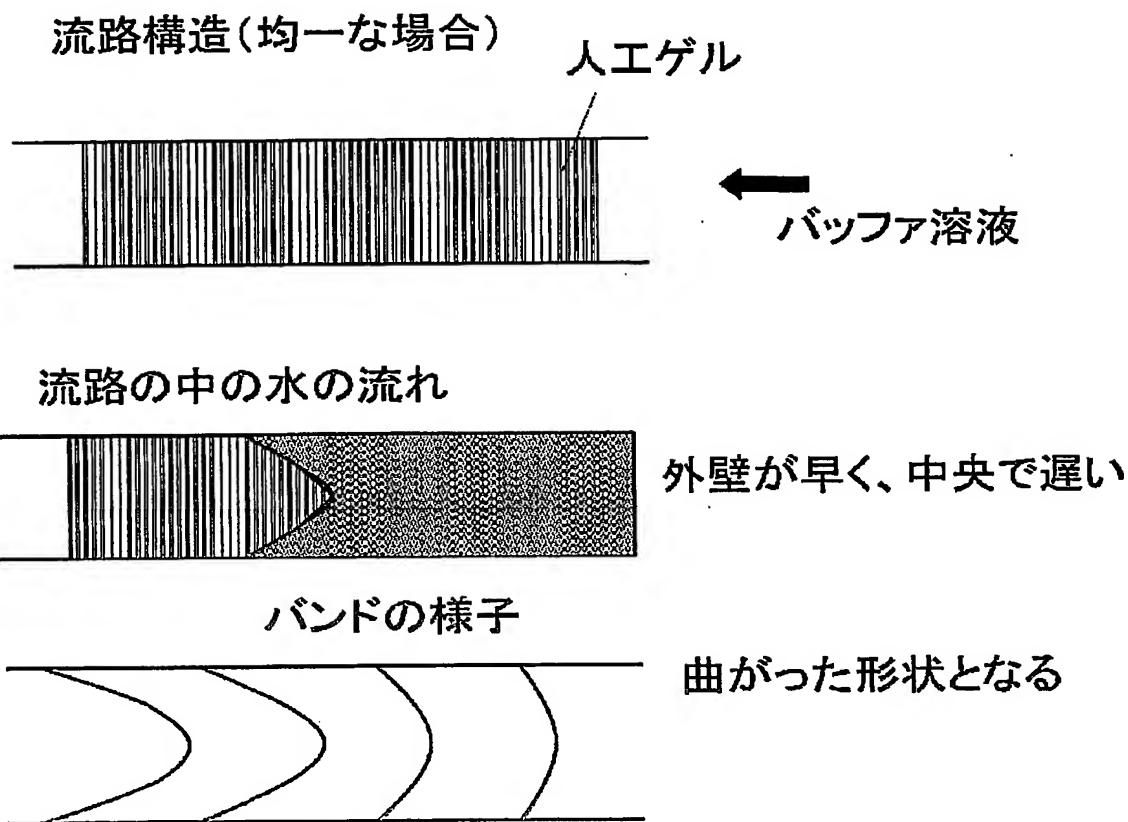
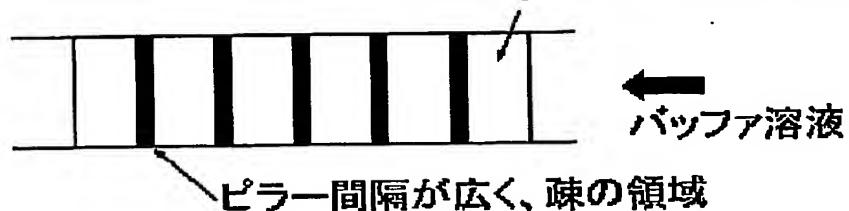


Fig.42

流路構造(間に疎の領域を入れた場合)  
ピラー間隔が狭く、密の領域



流路の中での水の流れ

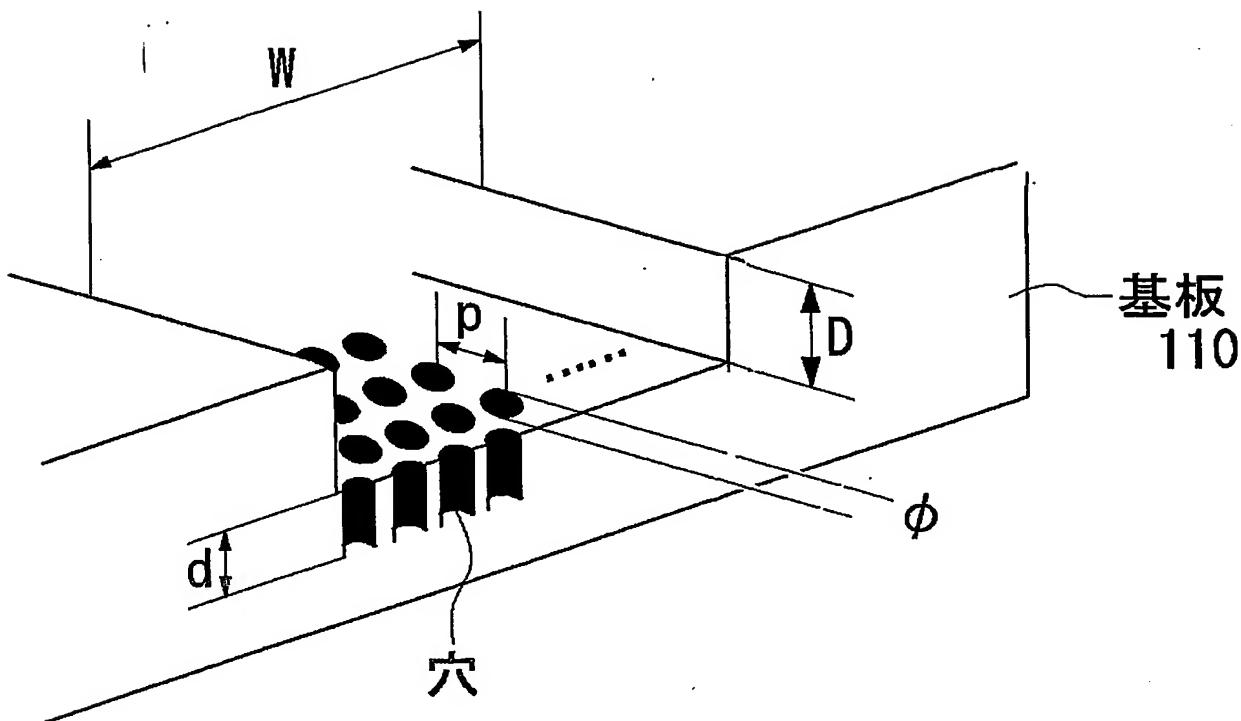
外壁が早く、  
中央で遅い

疎の領域で  
水が一時停止する

バンドの様子

まっすぐな形状となる

Fig.43



	小粒子の場合	大粒子の場合
W	10 ~ 2000 $\mu\text{m}$	
D	100nm 以下	3 $\mu\text{m}$ 以下
$\phi$	50nm 以下	300nm 以下
d	100nm 以下	3 $\mu\text{m}$ 以下
p	50nm 以下	300nm 以下

Fig. 44

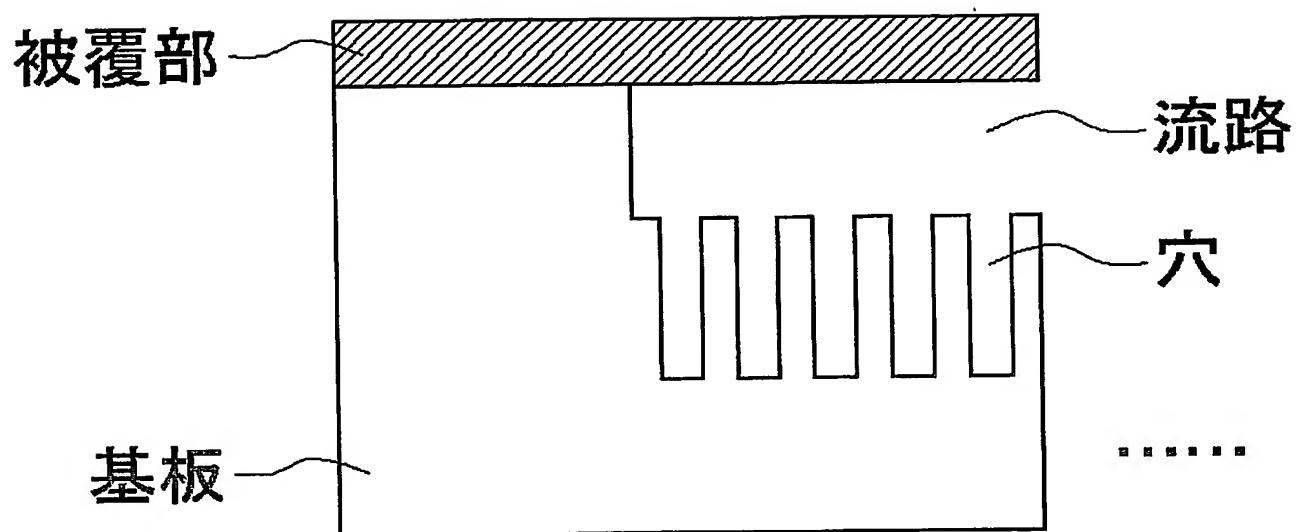


Fig.45

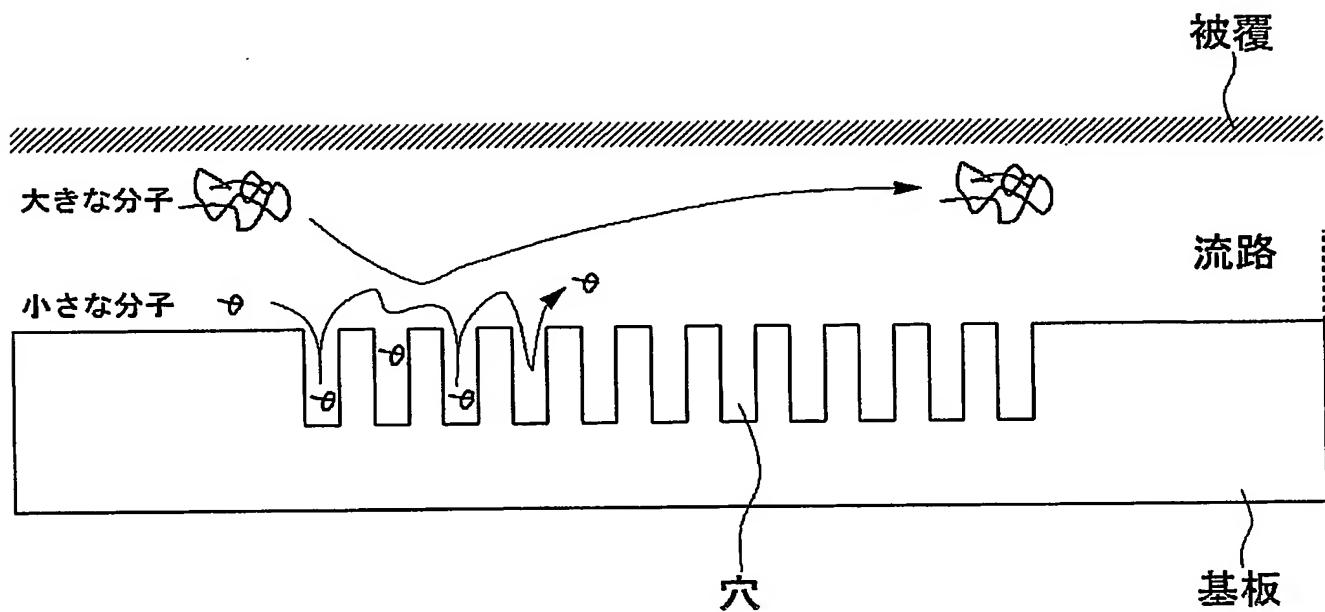


Fig.46

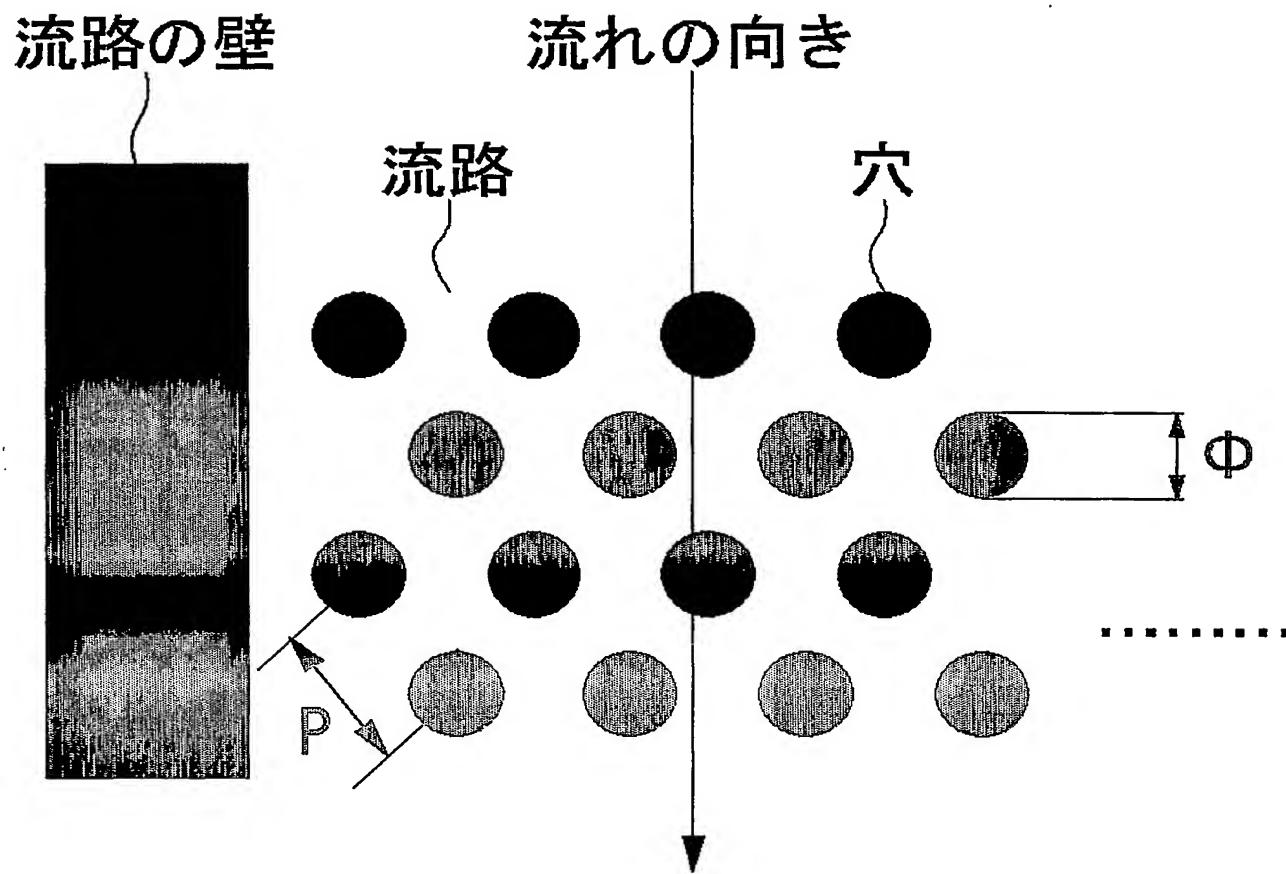


Fig.47

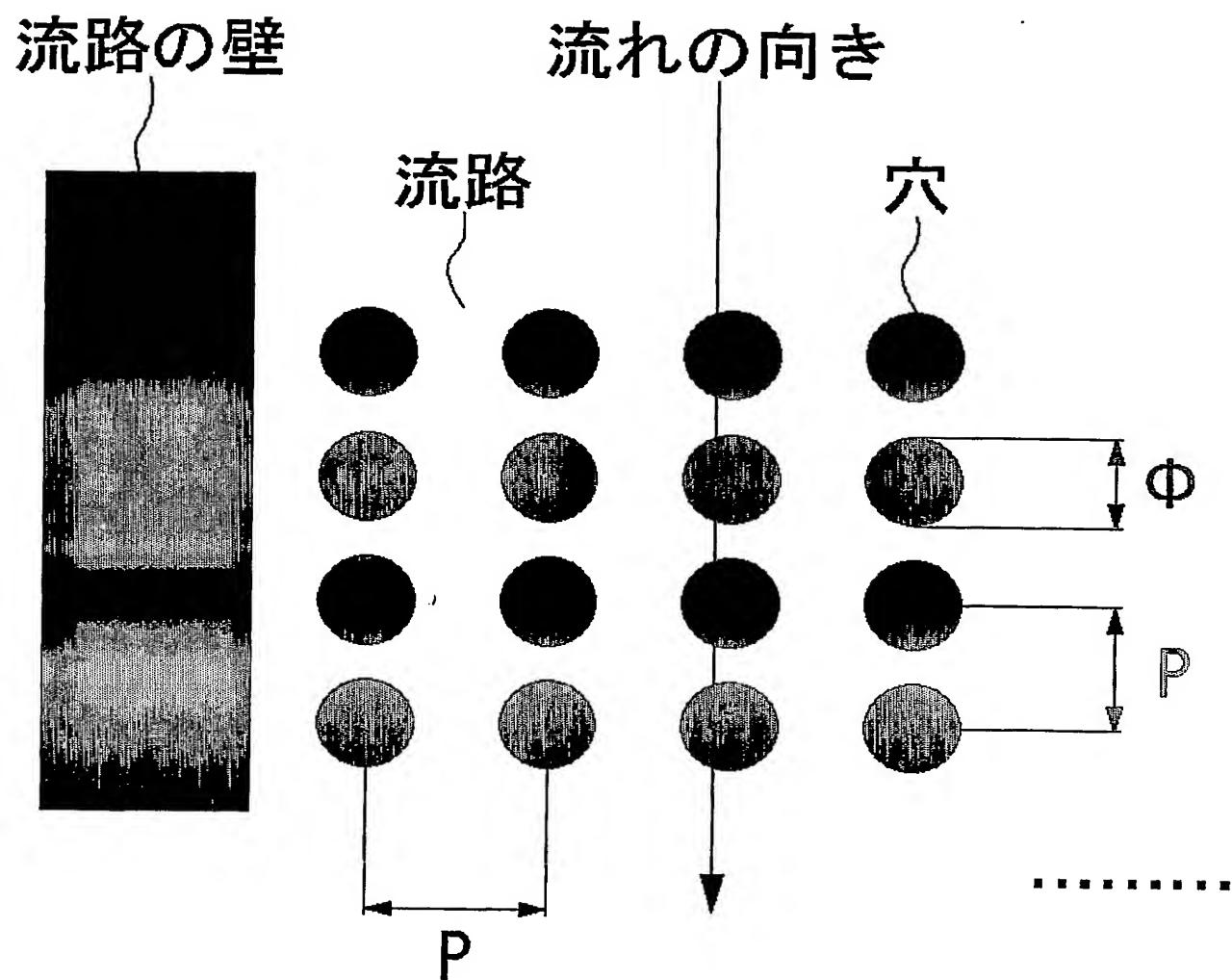


Fig.48

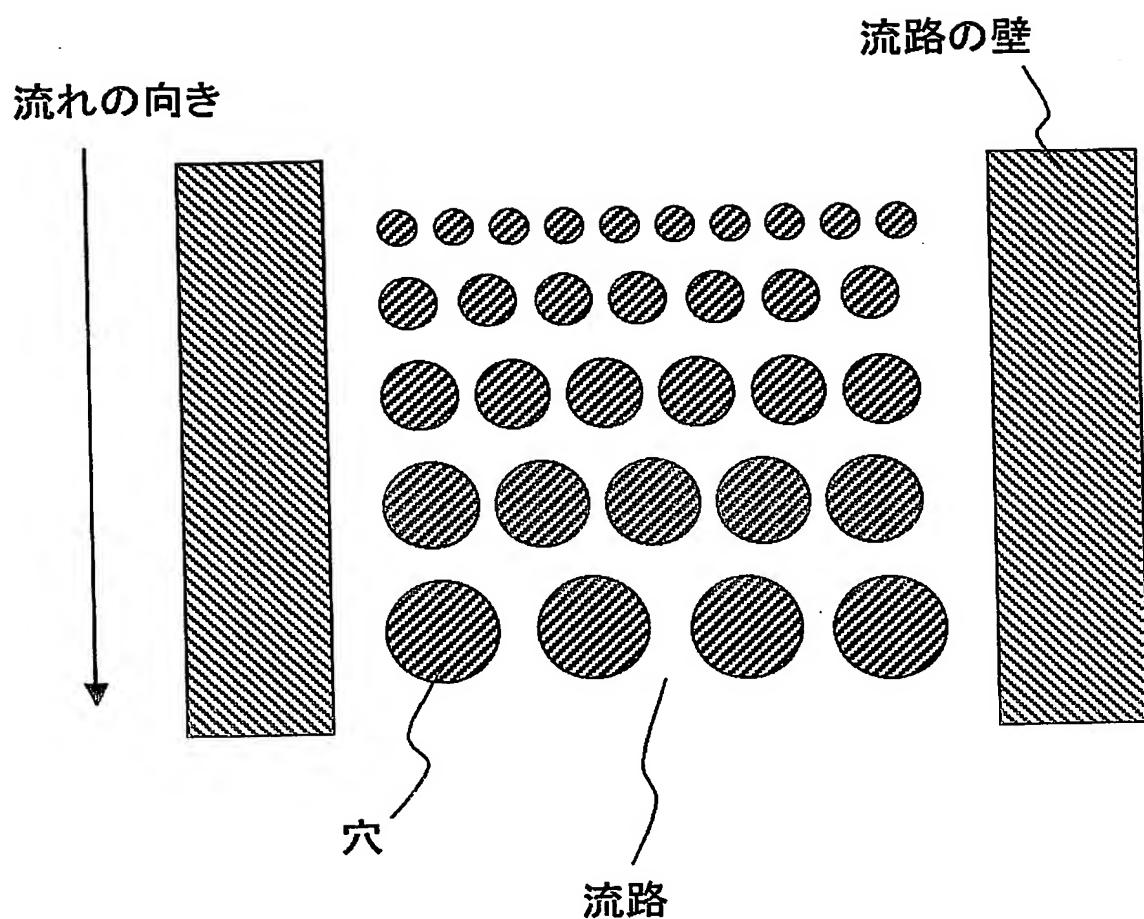


Fig.49

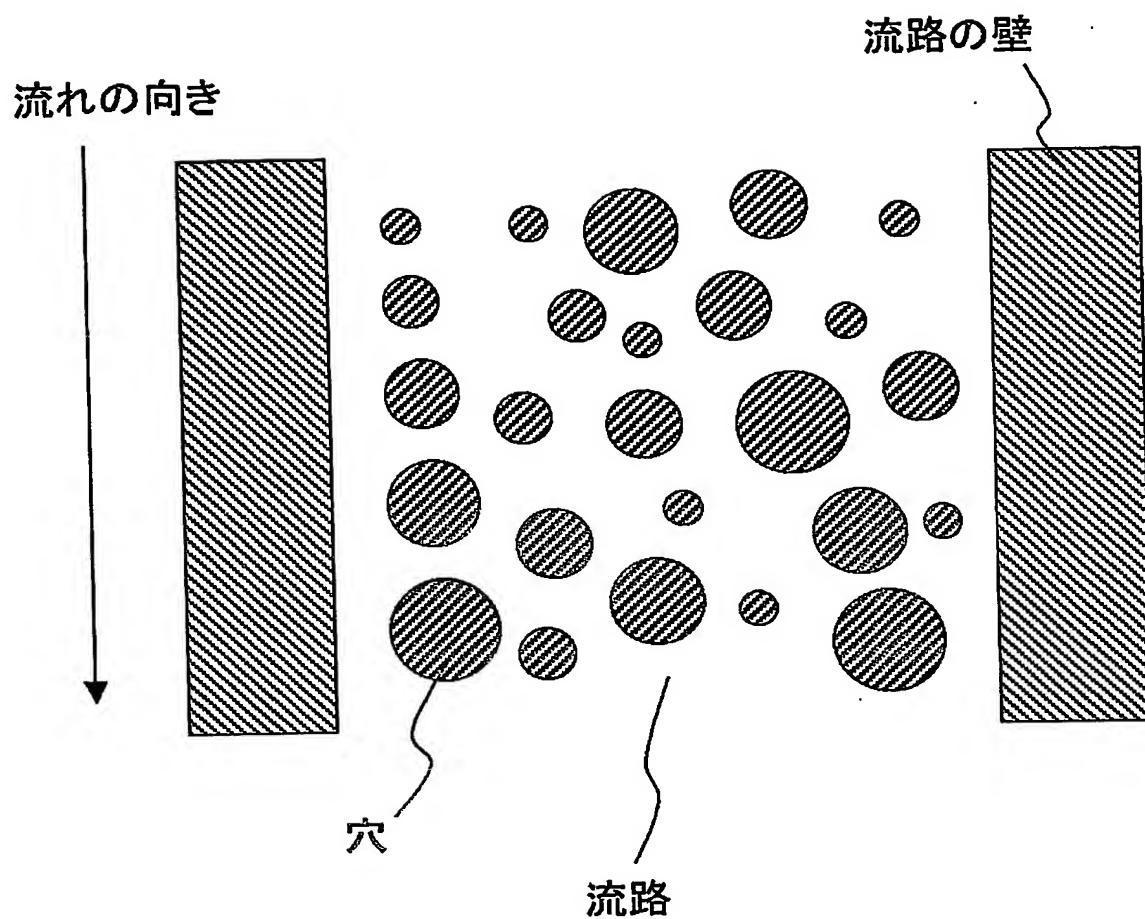


Fig.50

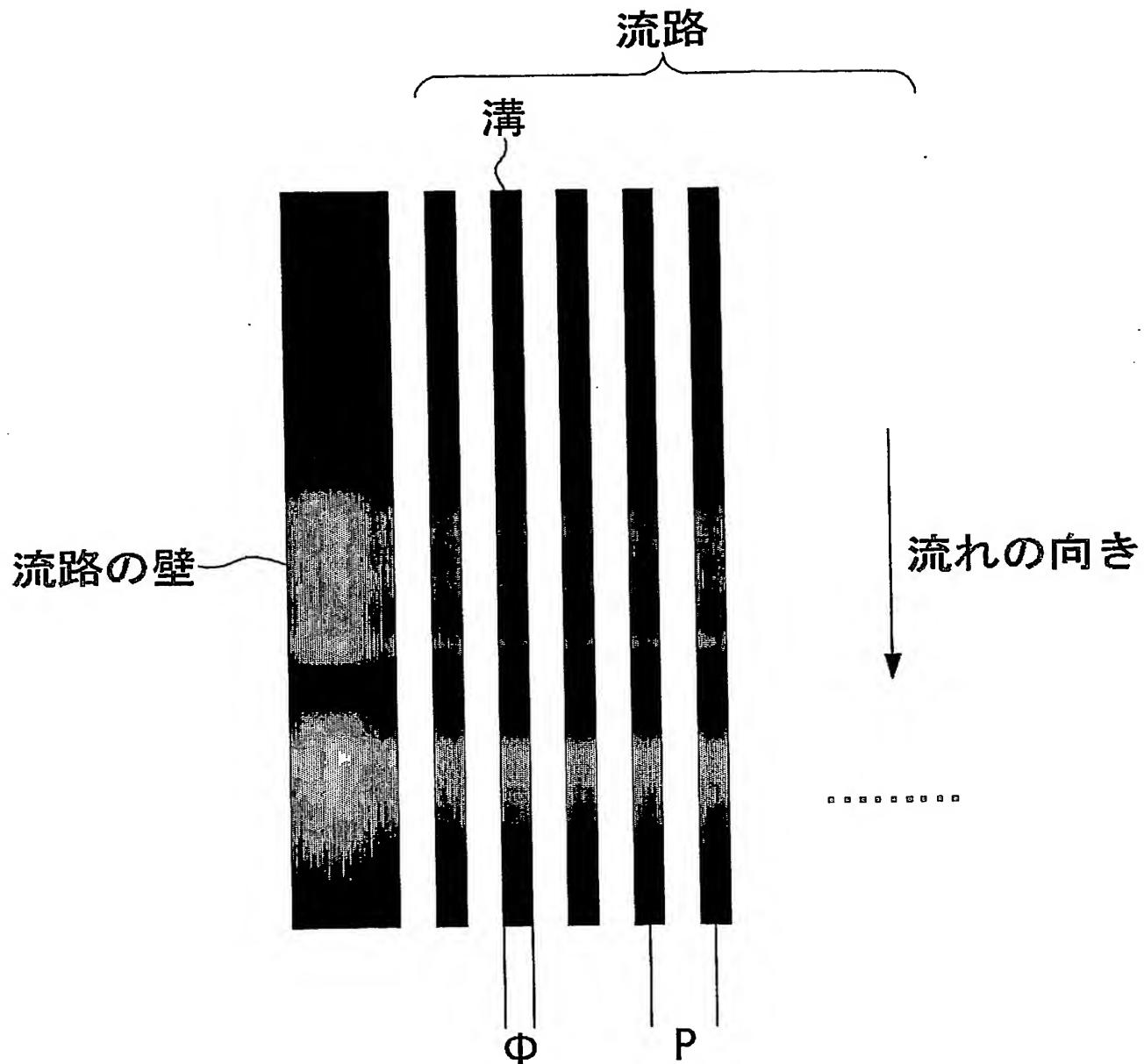


Fig.51

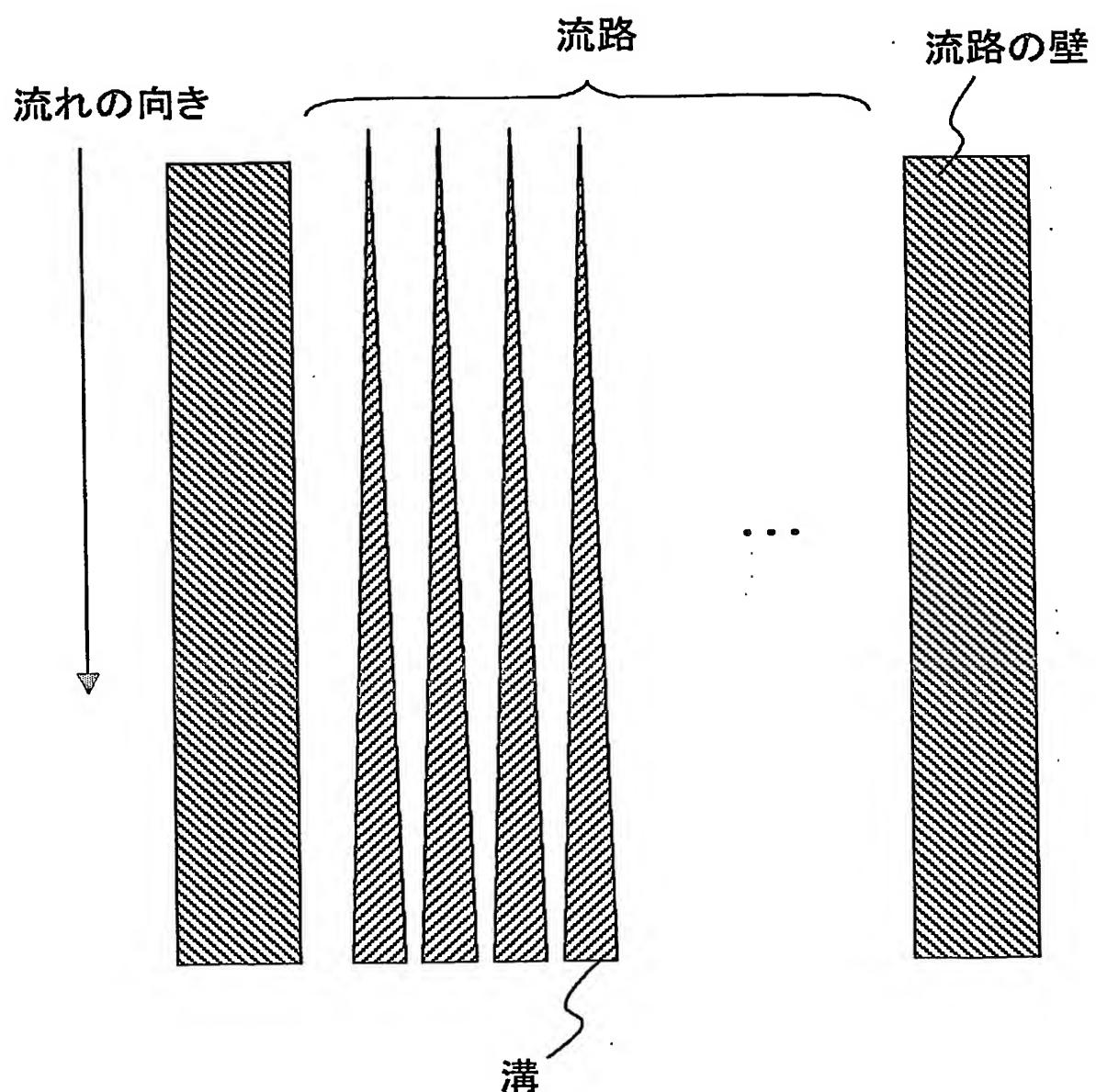


Fig.52

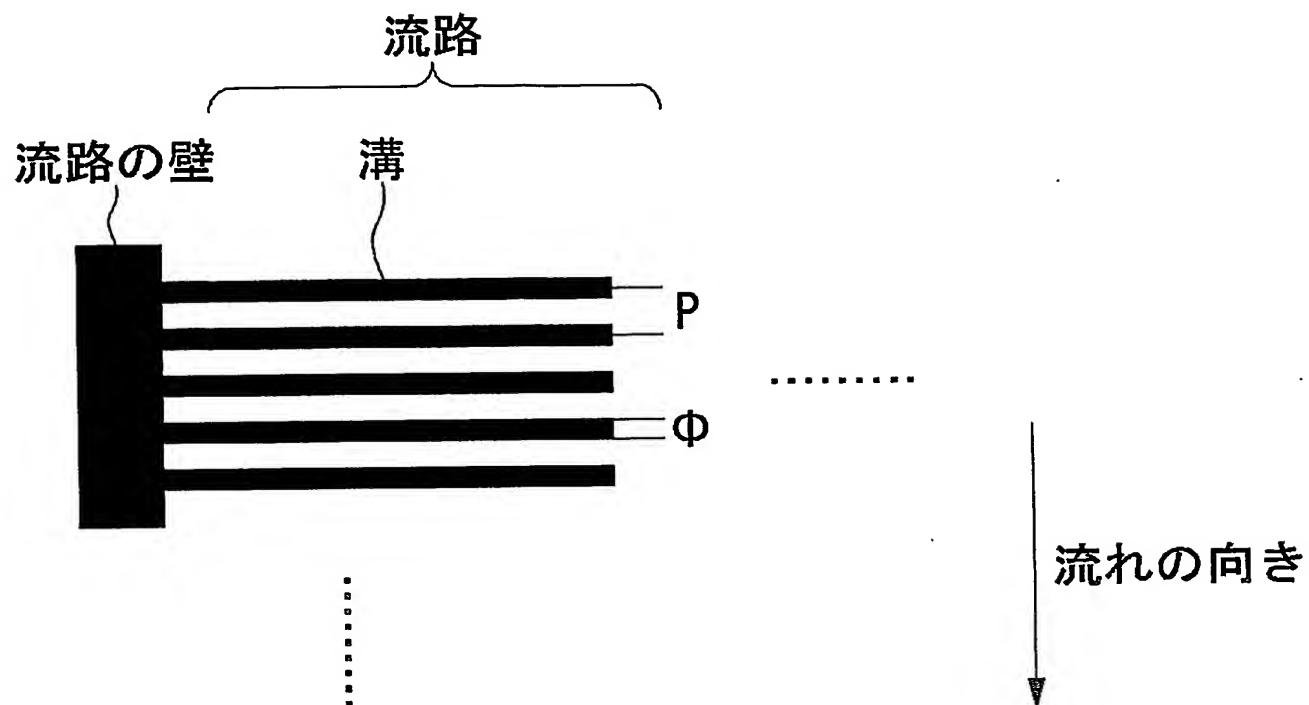
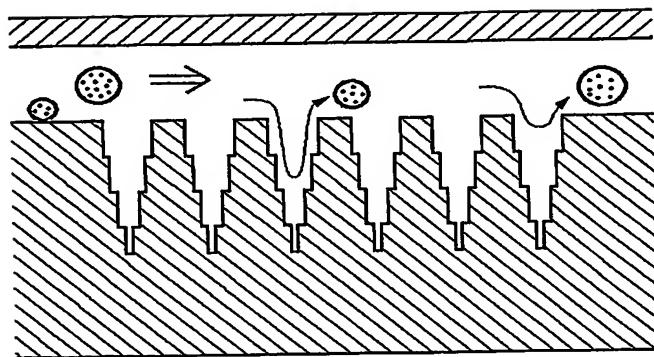
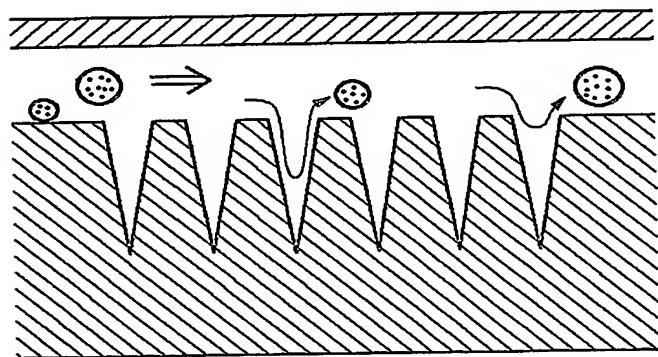


Fig.53

(a)



(b)



(c)

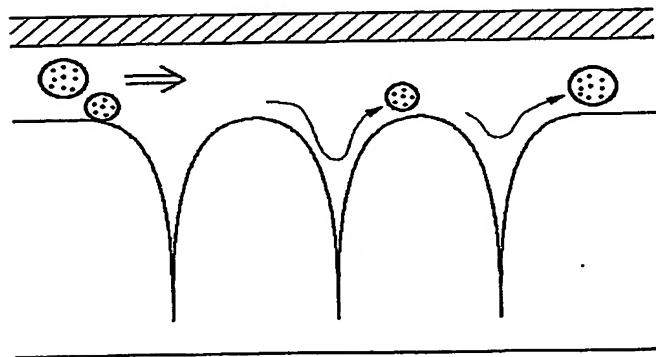
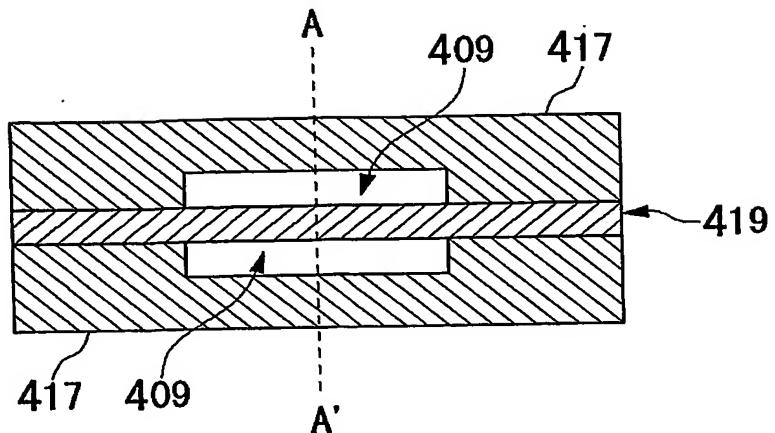
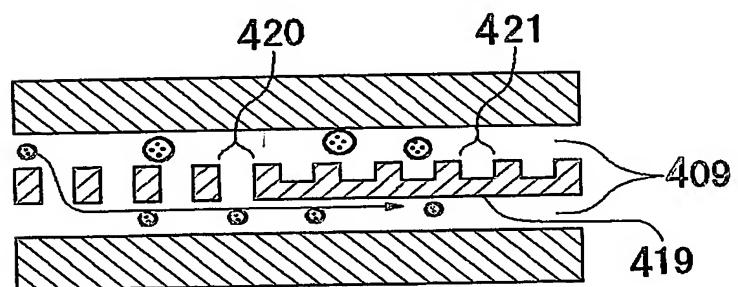


Fig.54

(a)



(b)



(c)

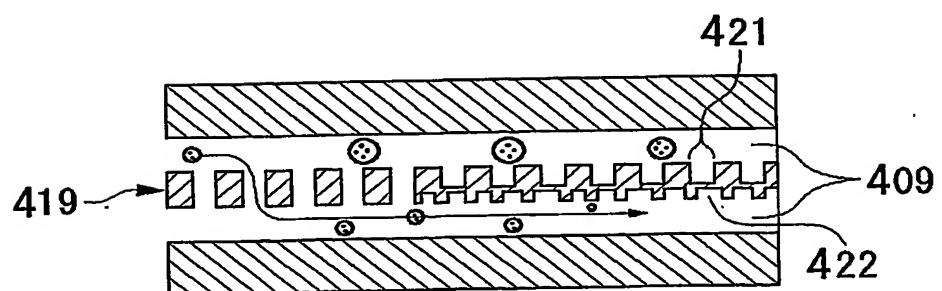
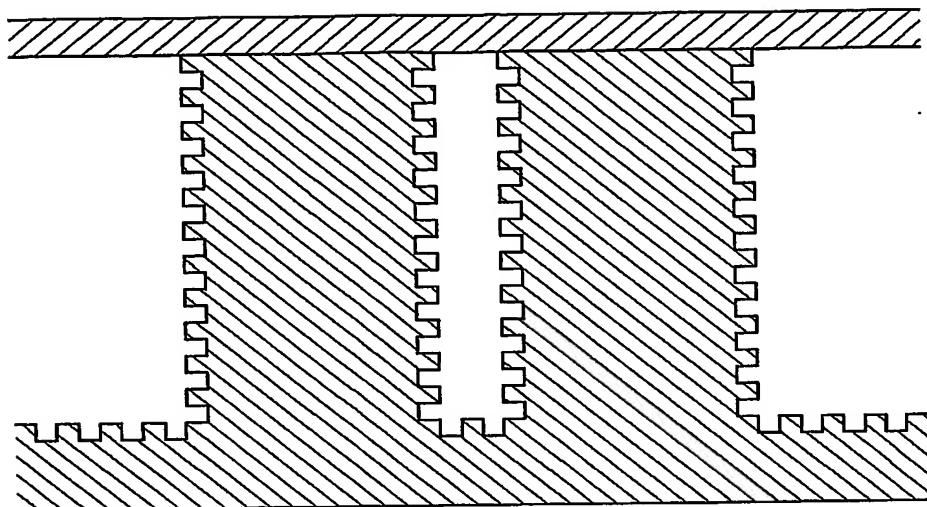


Fig.55

(a)



(b)

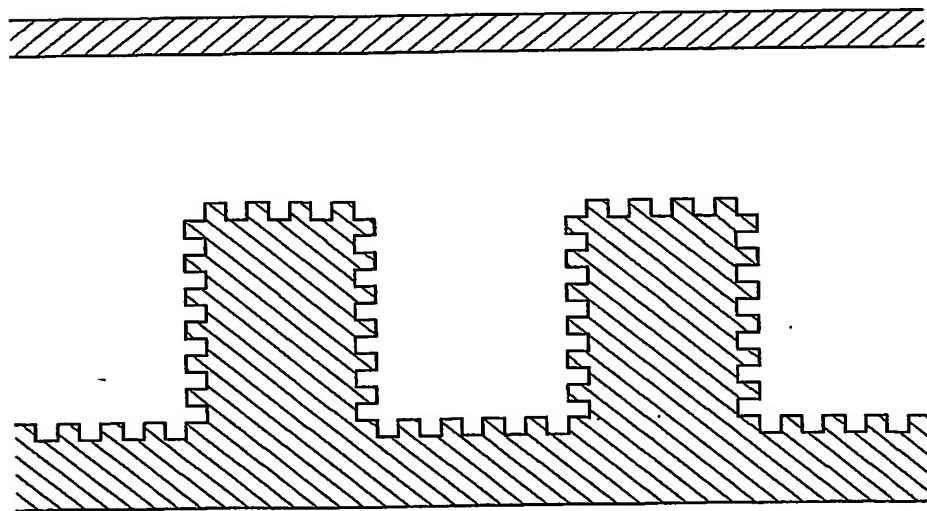


Fig.56

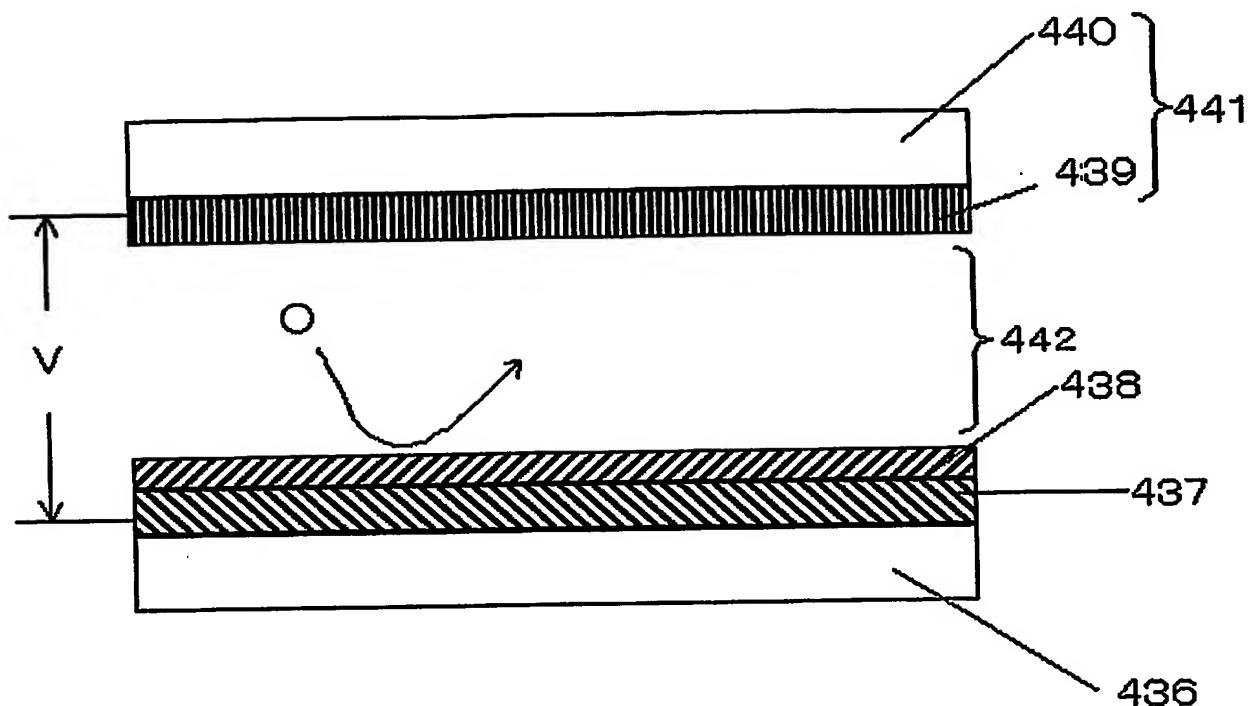


Fig.57

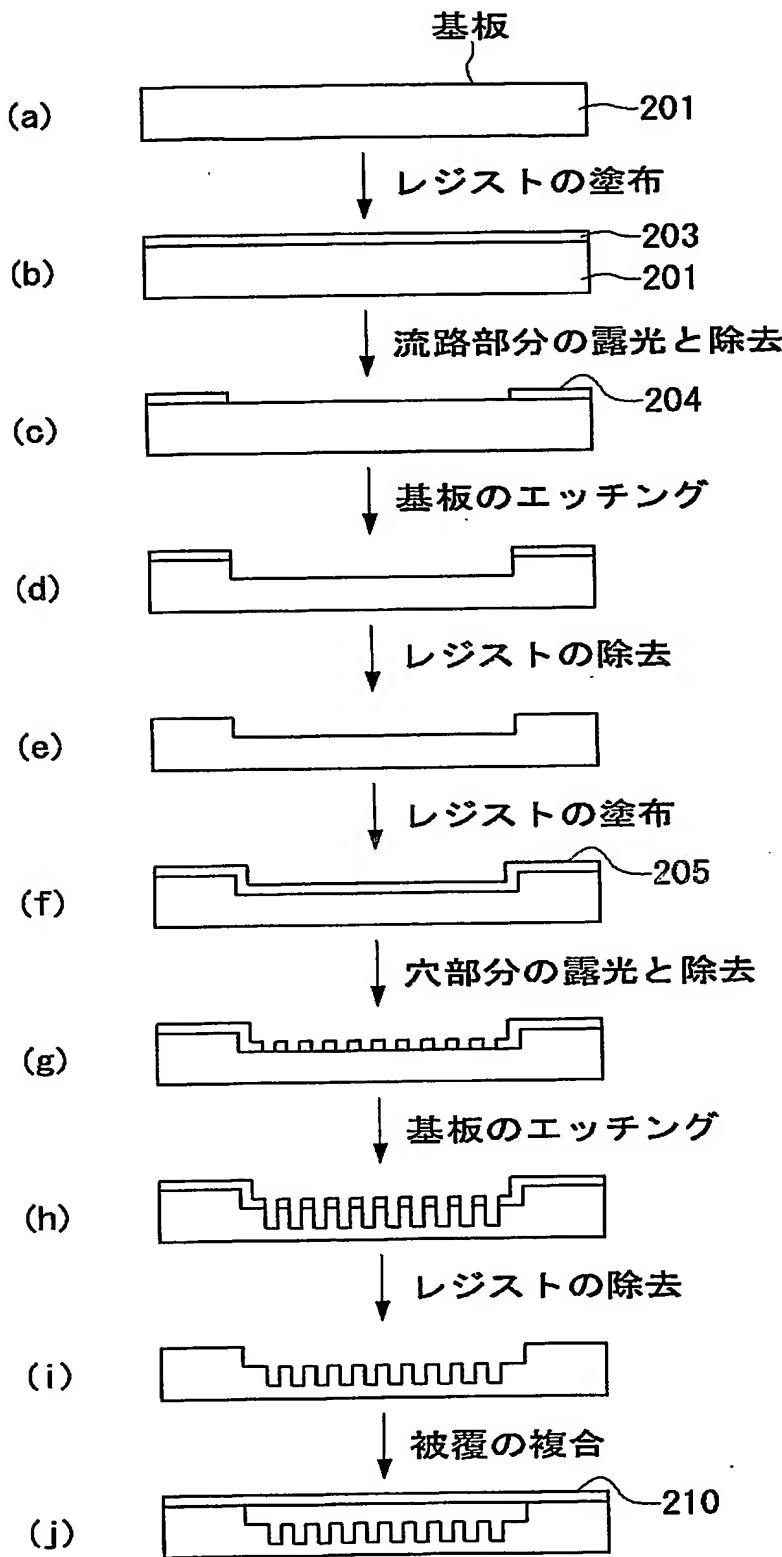


Fig.58

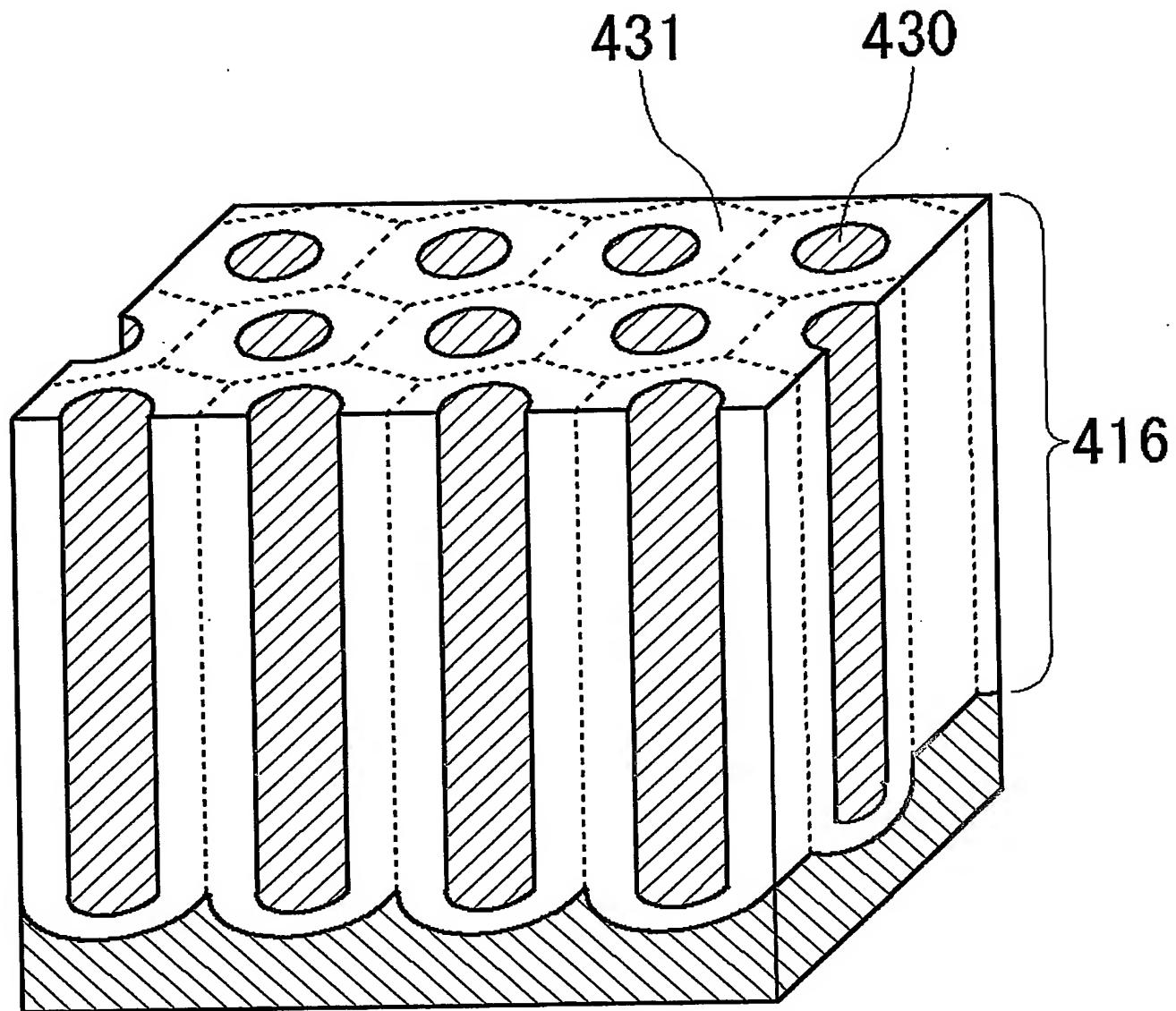


Fig.59

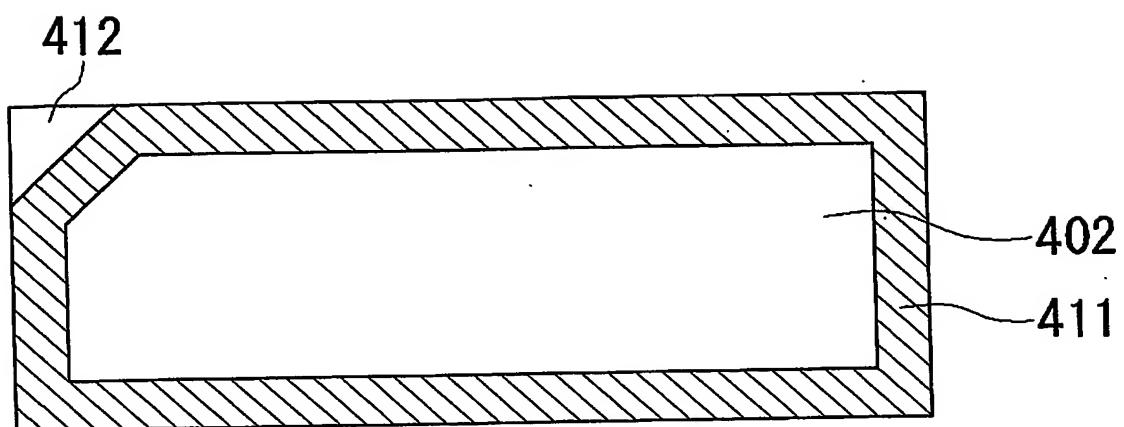


Fig.60

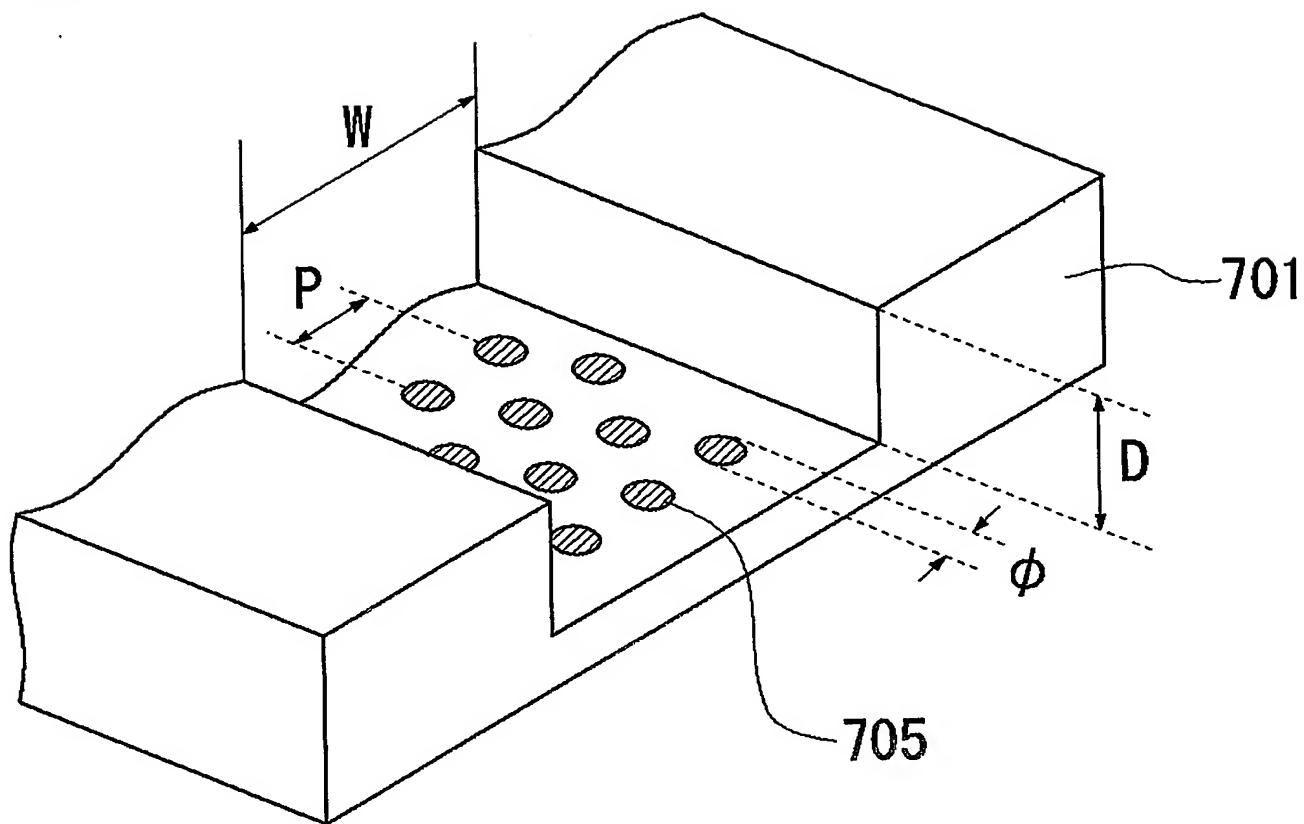
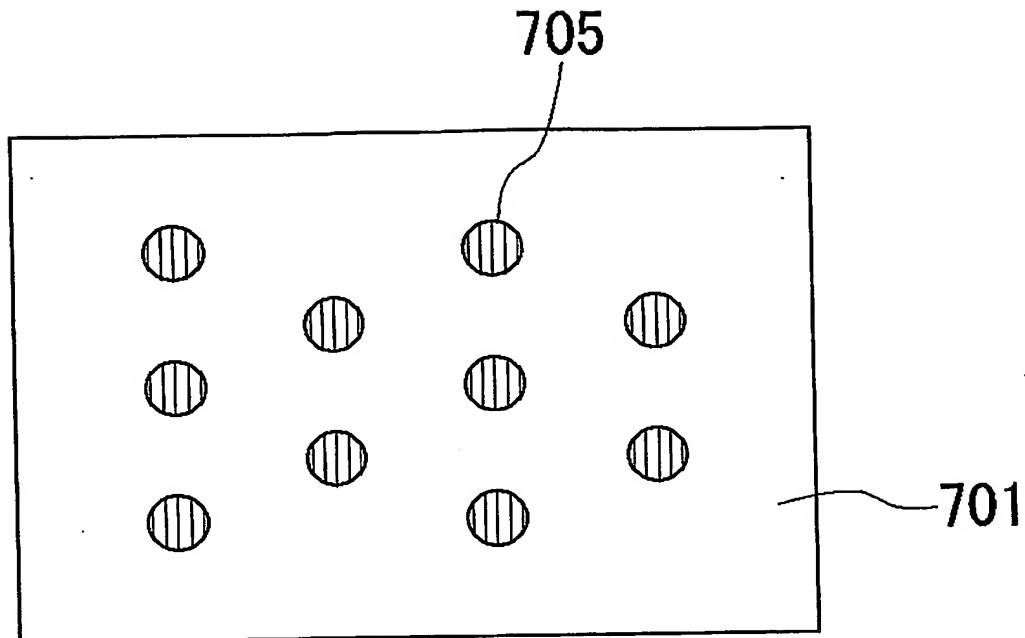


Fig.61

(a)



(b)

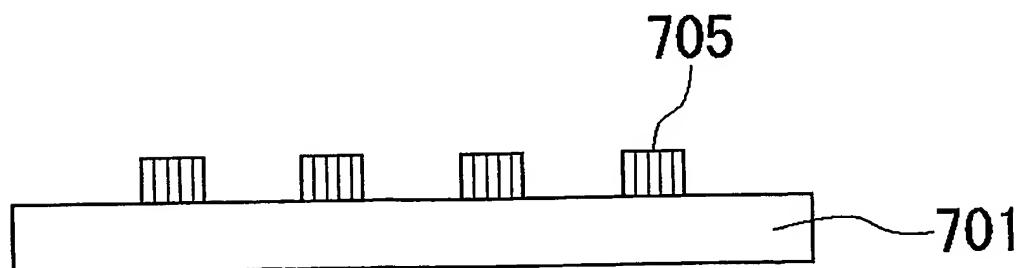


Fig.62

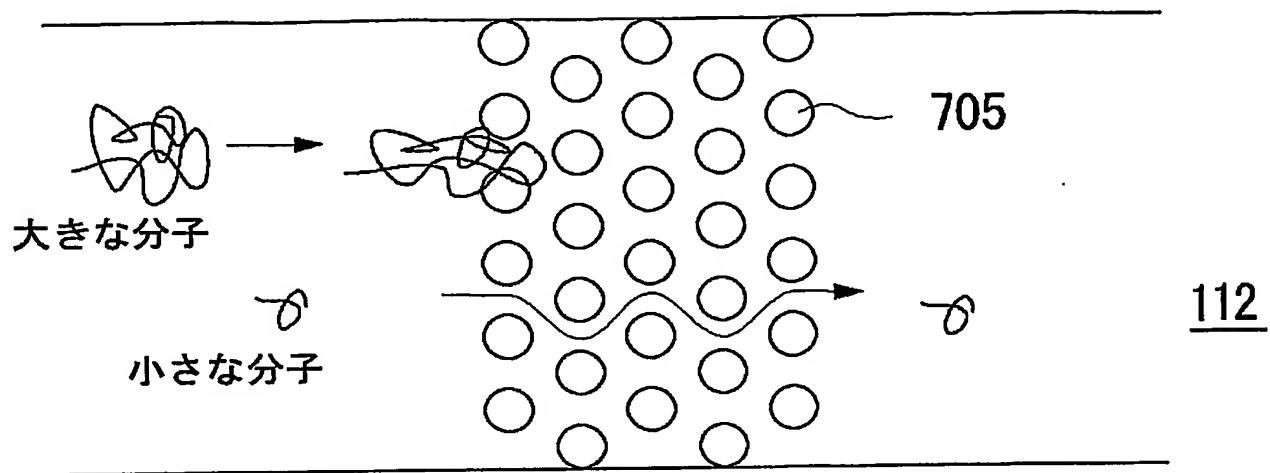


Fig.63

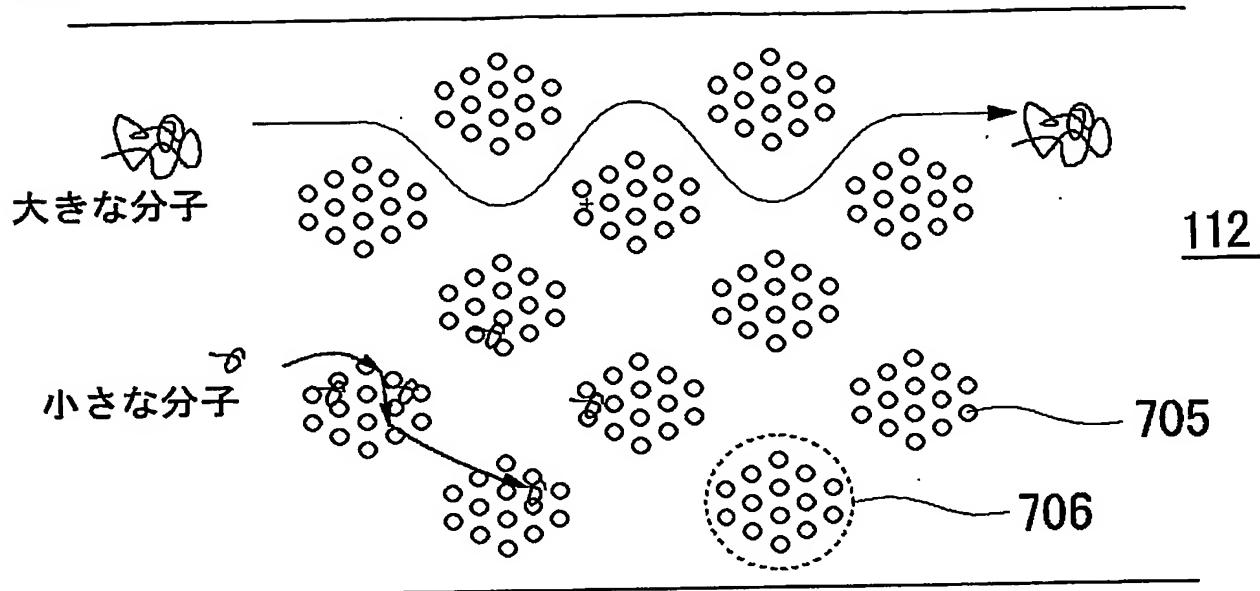
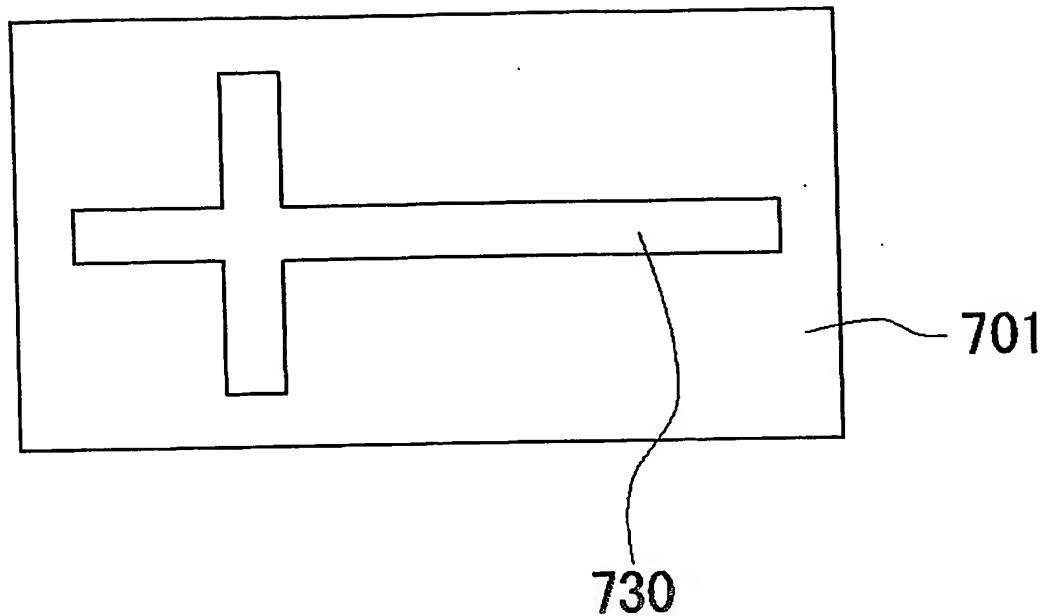


Fig.64

(a)



(b)

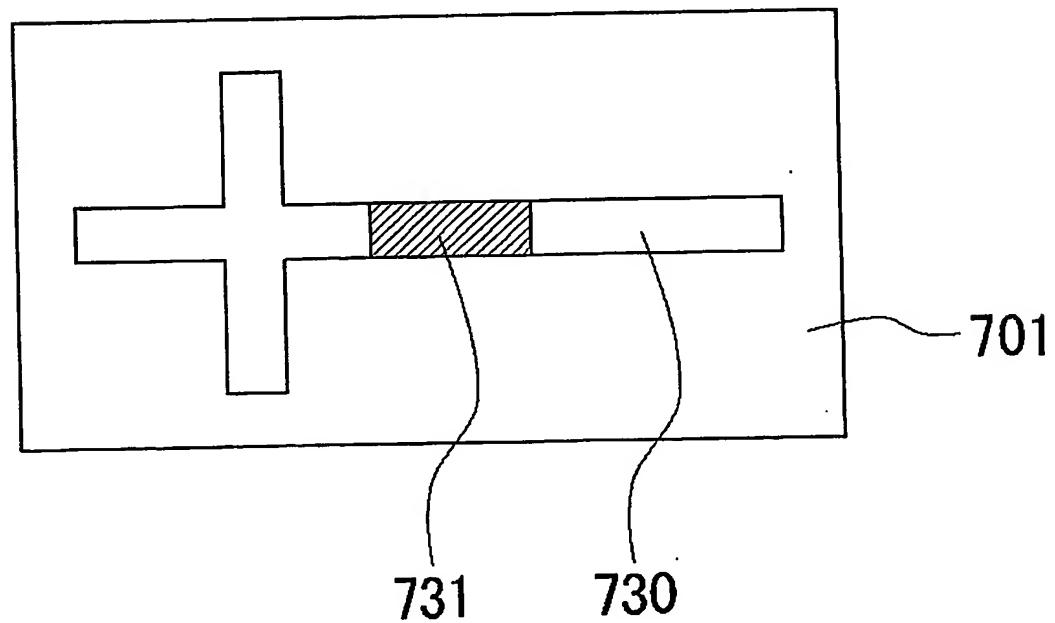
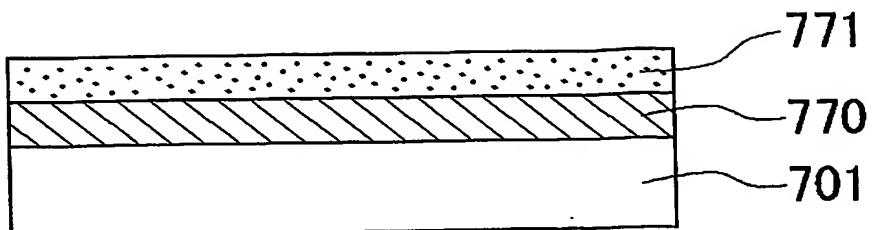
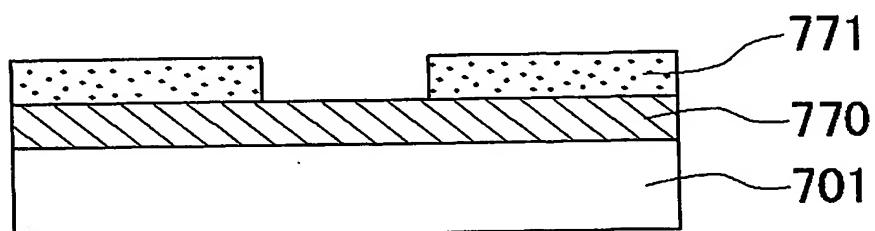


Fig.65

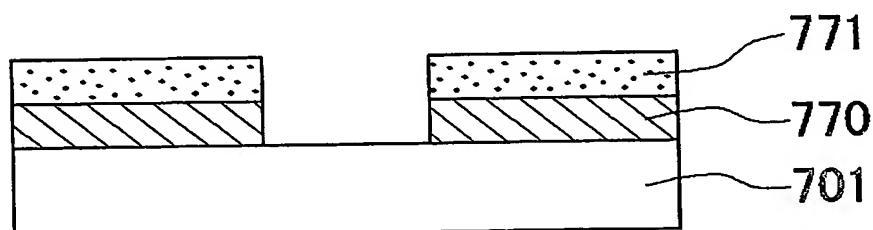
(a)



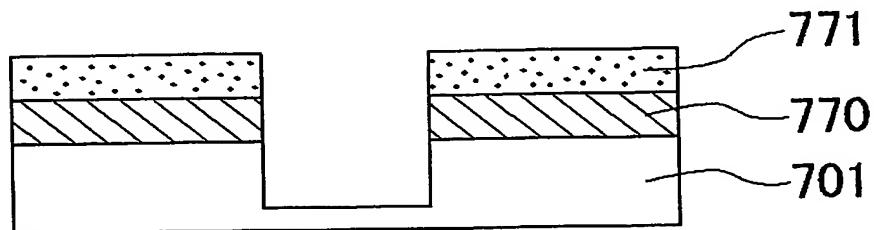
(b)



(c)



(d)



(e)



Fig.66

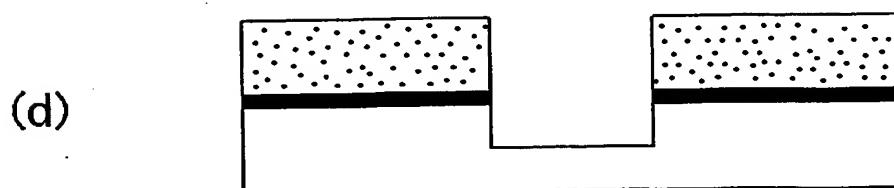
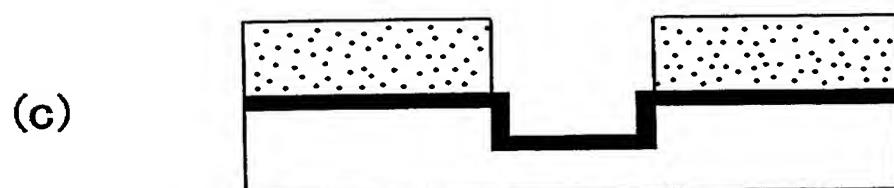
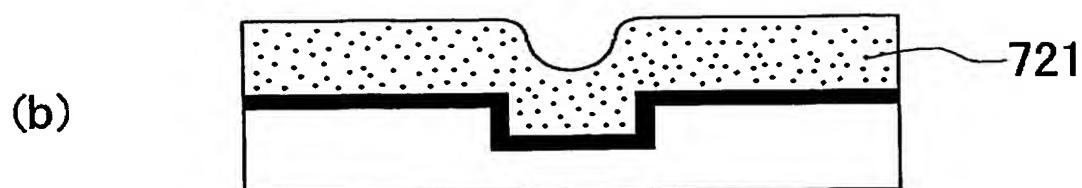
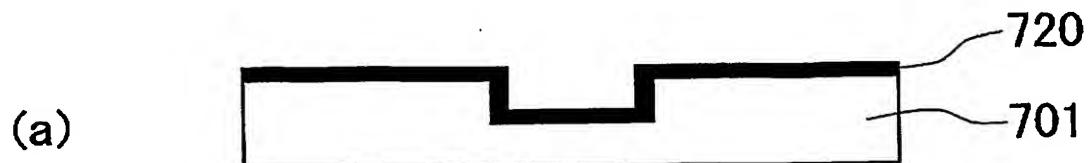
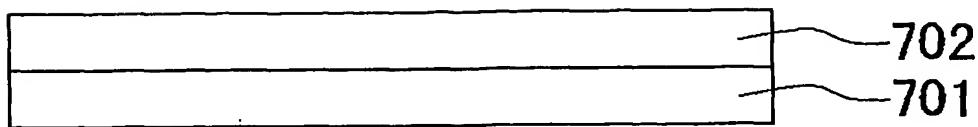
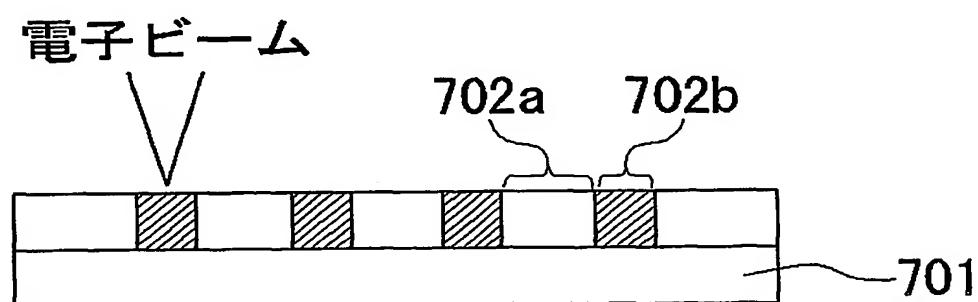


Fig.67

(a)



(b)



(c)



(d)

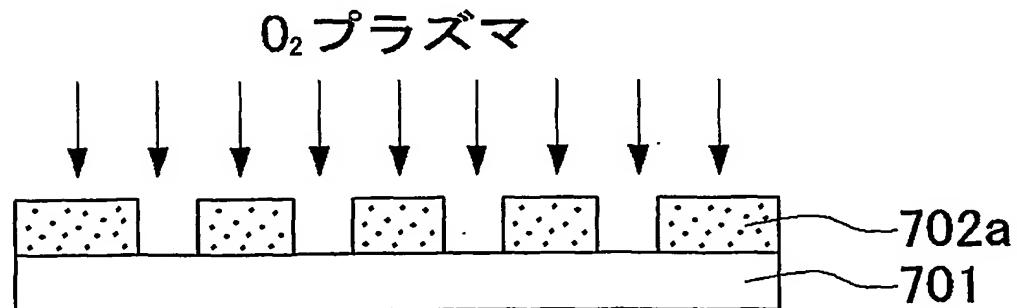


Fig.68

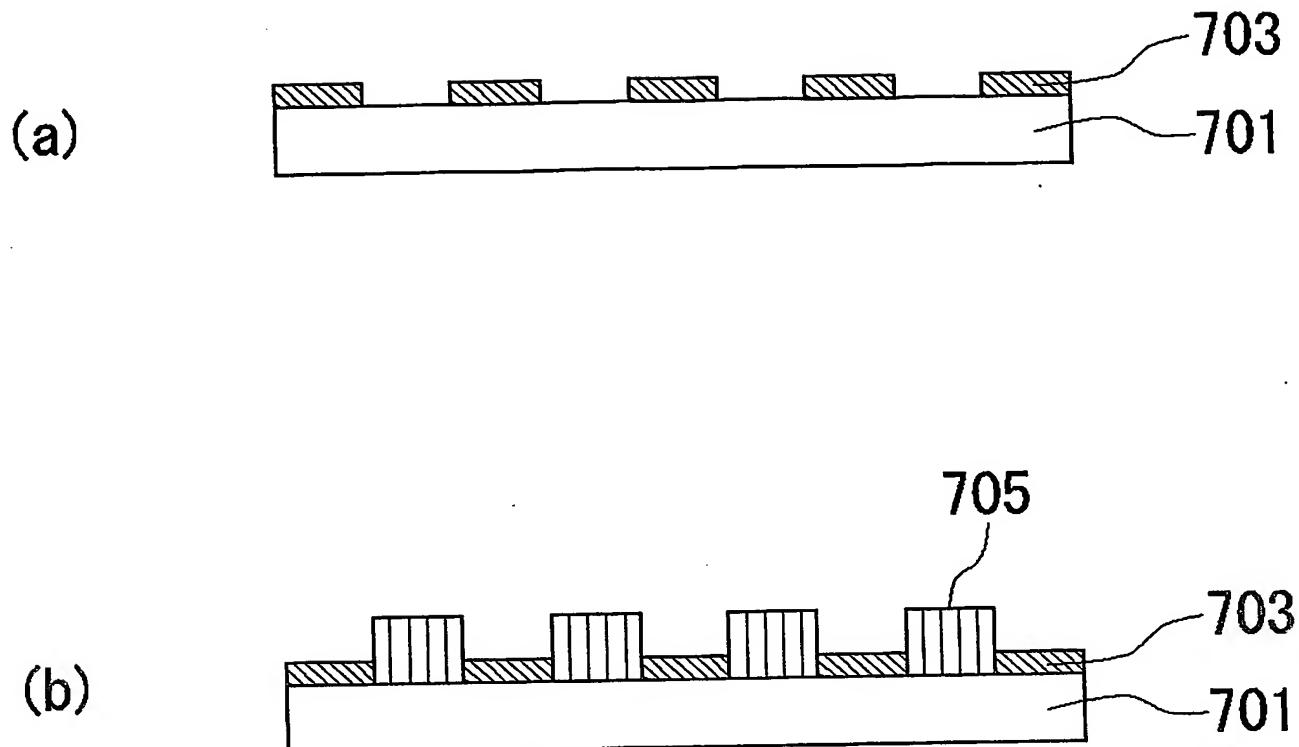
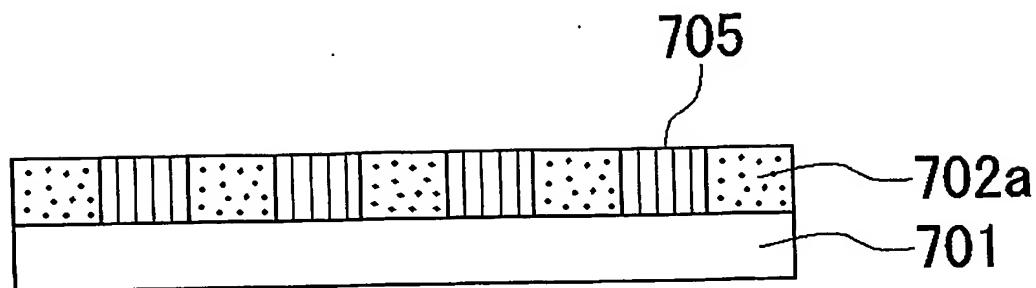


Fig.69

(a)



(b)

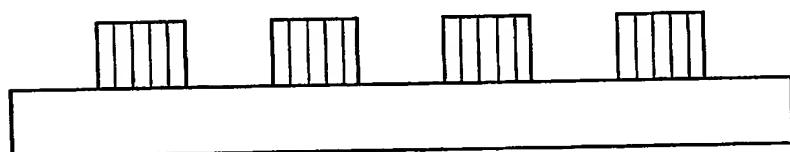
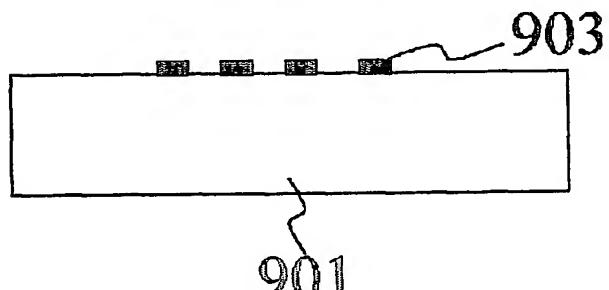
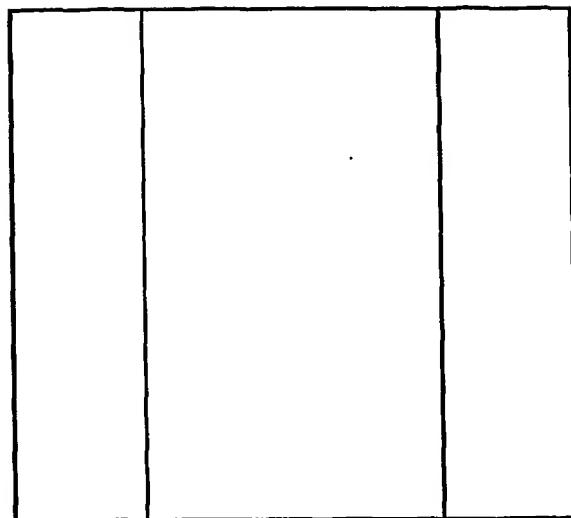
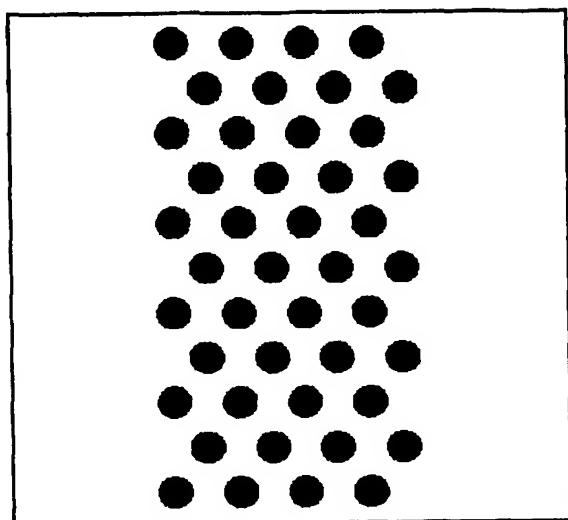
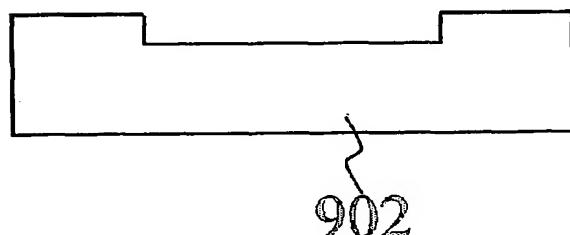


Fig. 70



(a)



(b)

Fig.71

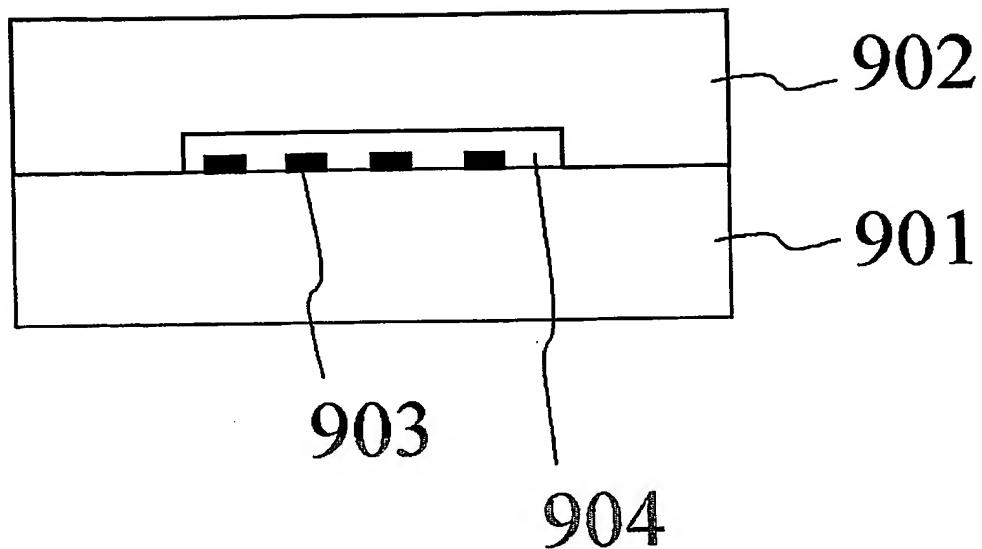


Fig.72

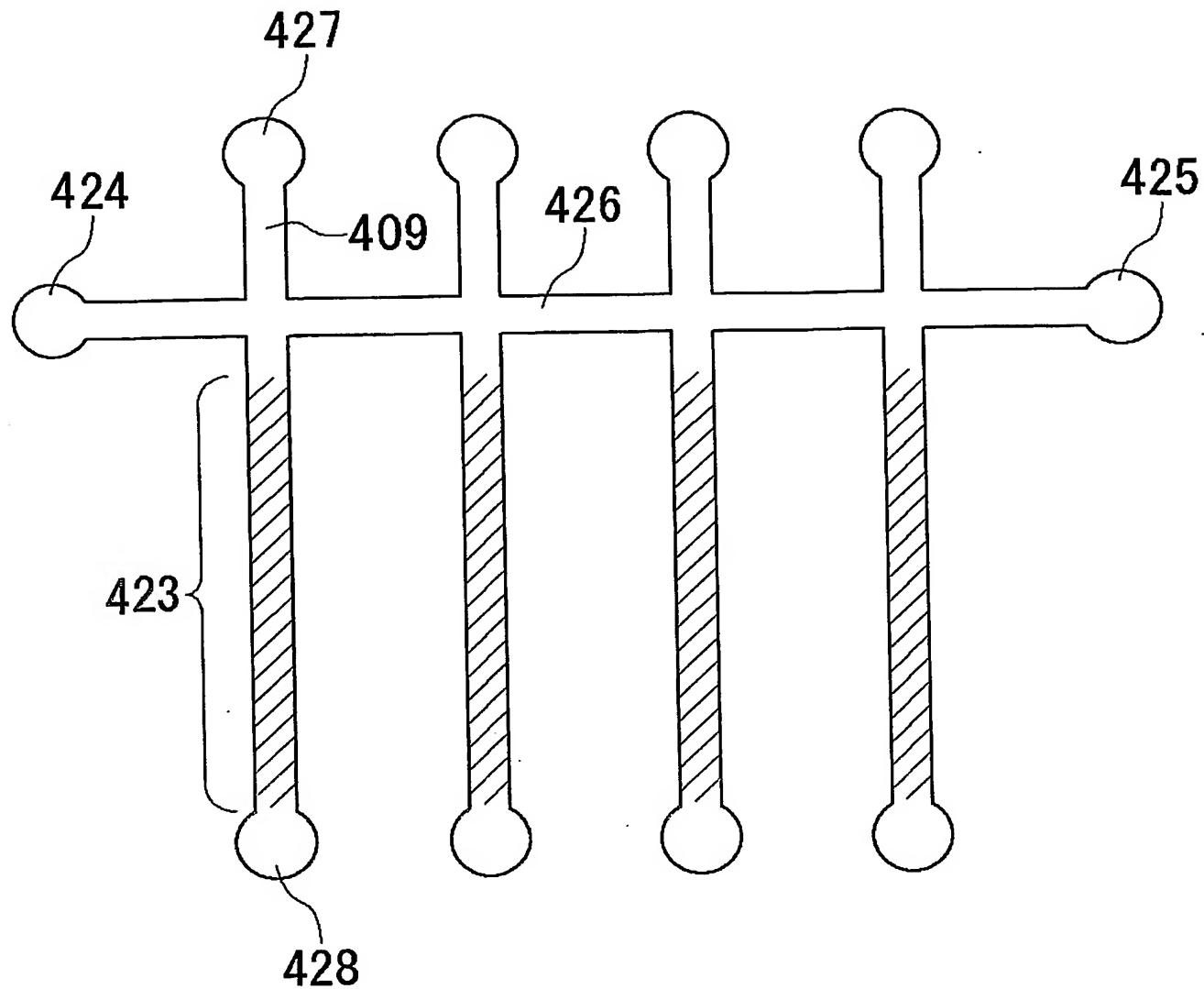


Fig.73

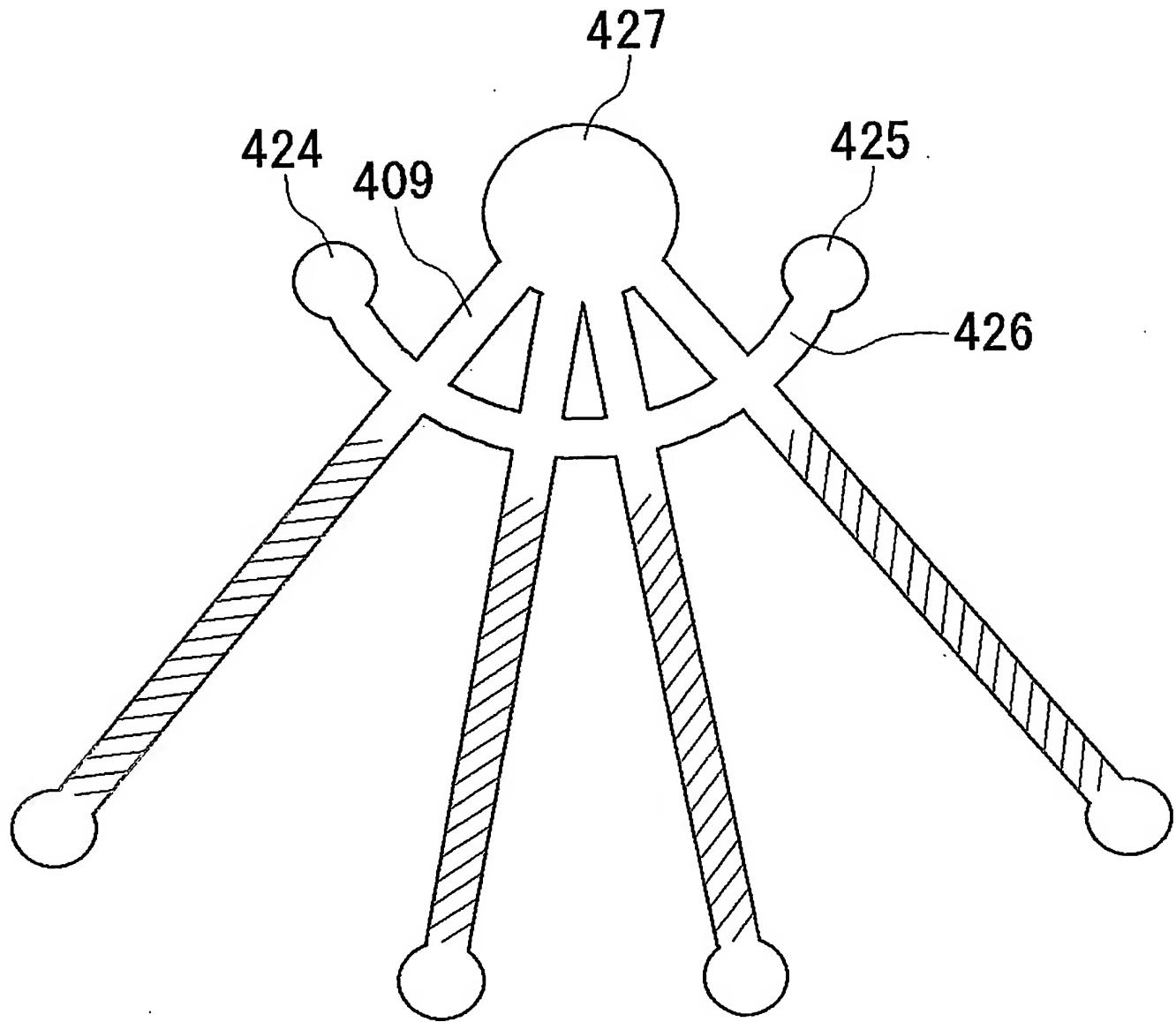


Fig.74

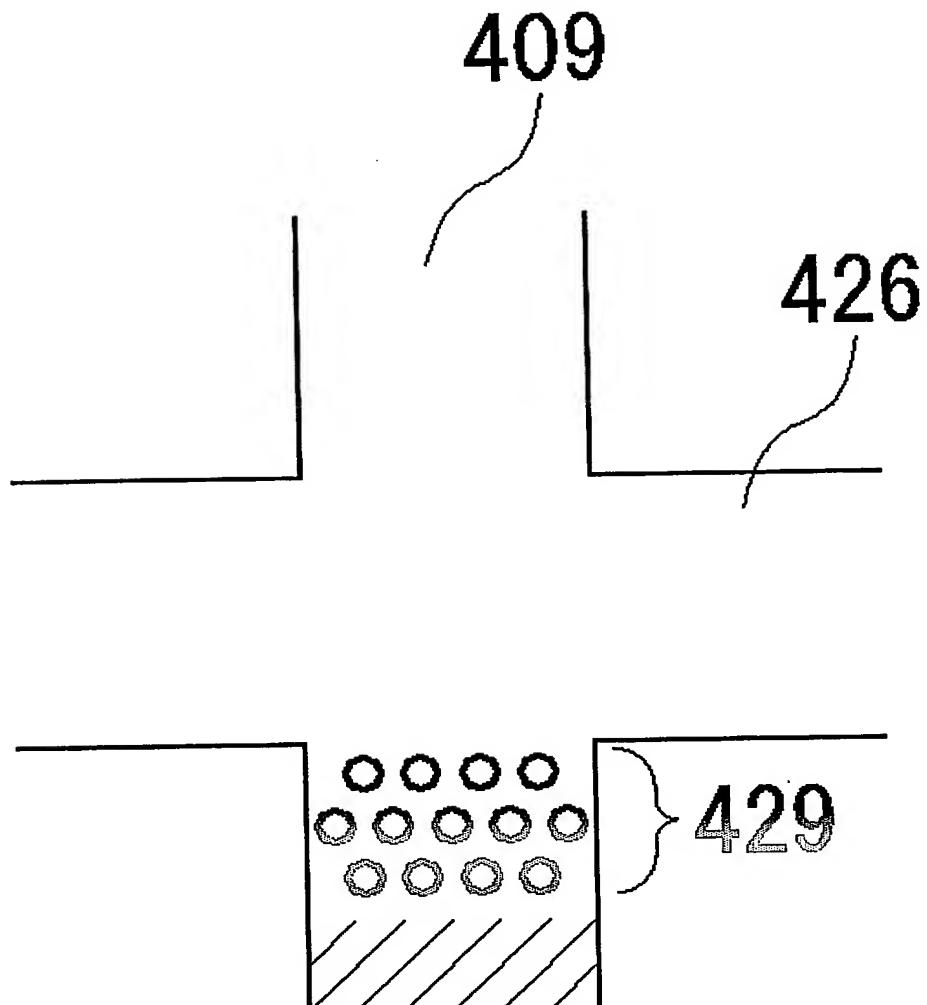
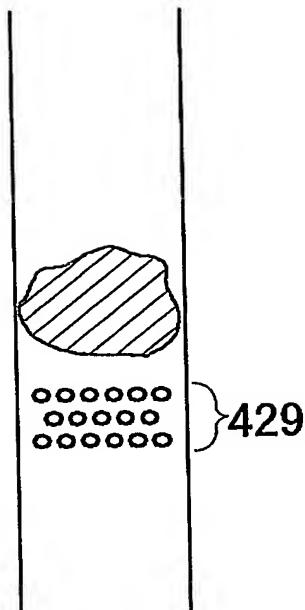


Fig.75

(a)



(b)

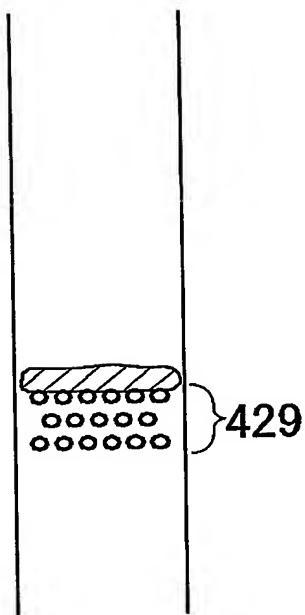
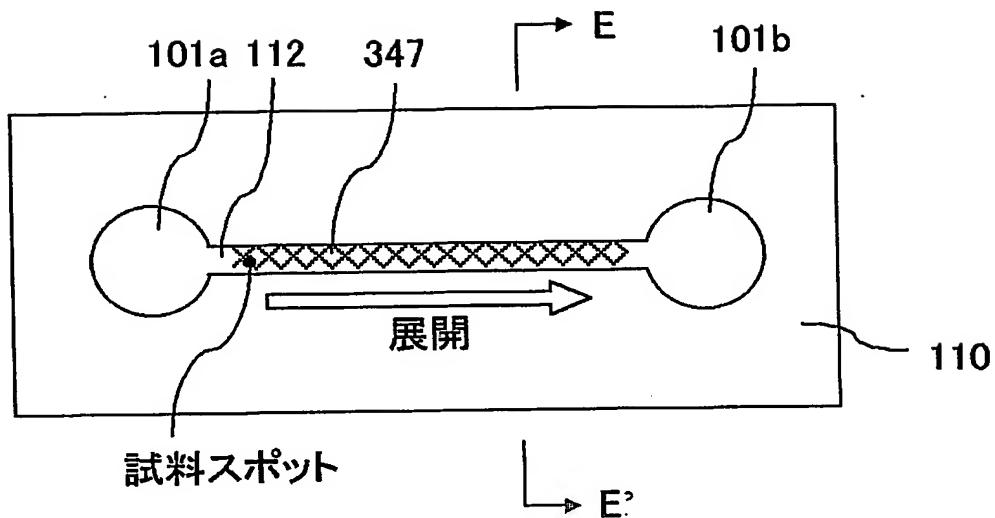


Fig.76

(a)



(b)

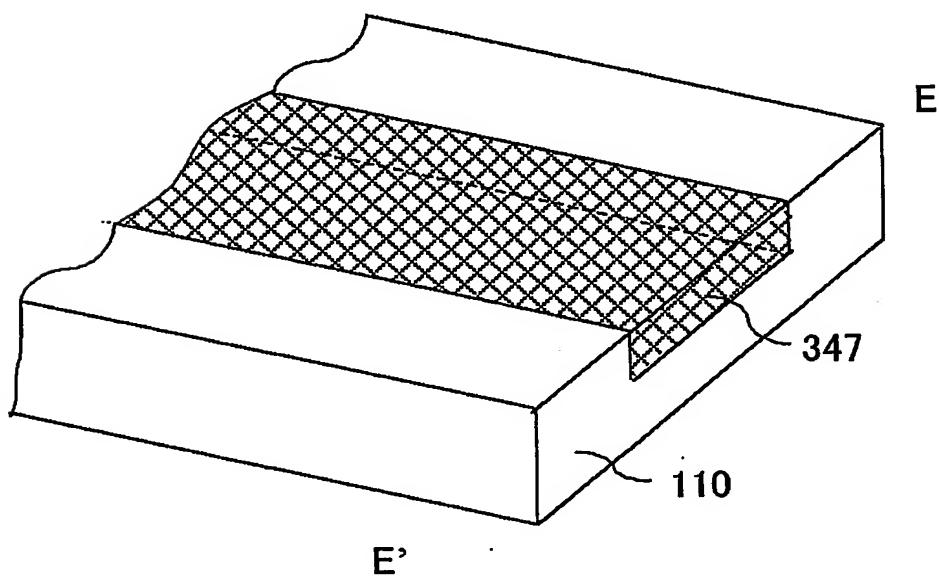


Fig.77

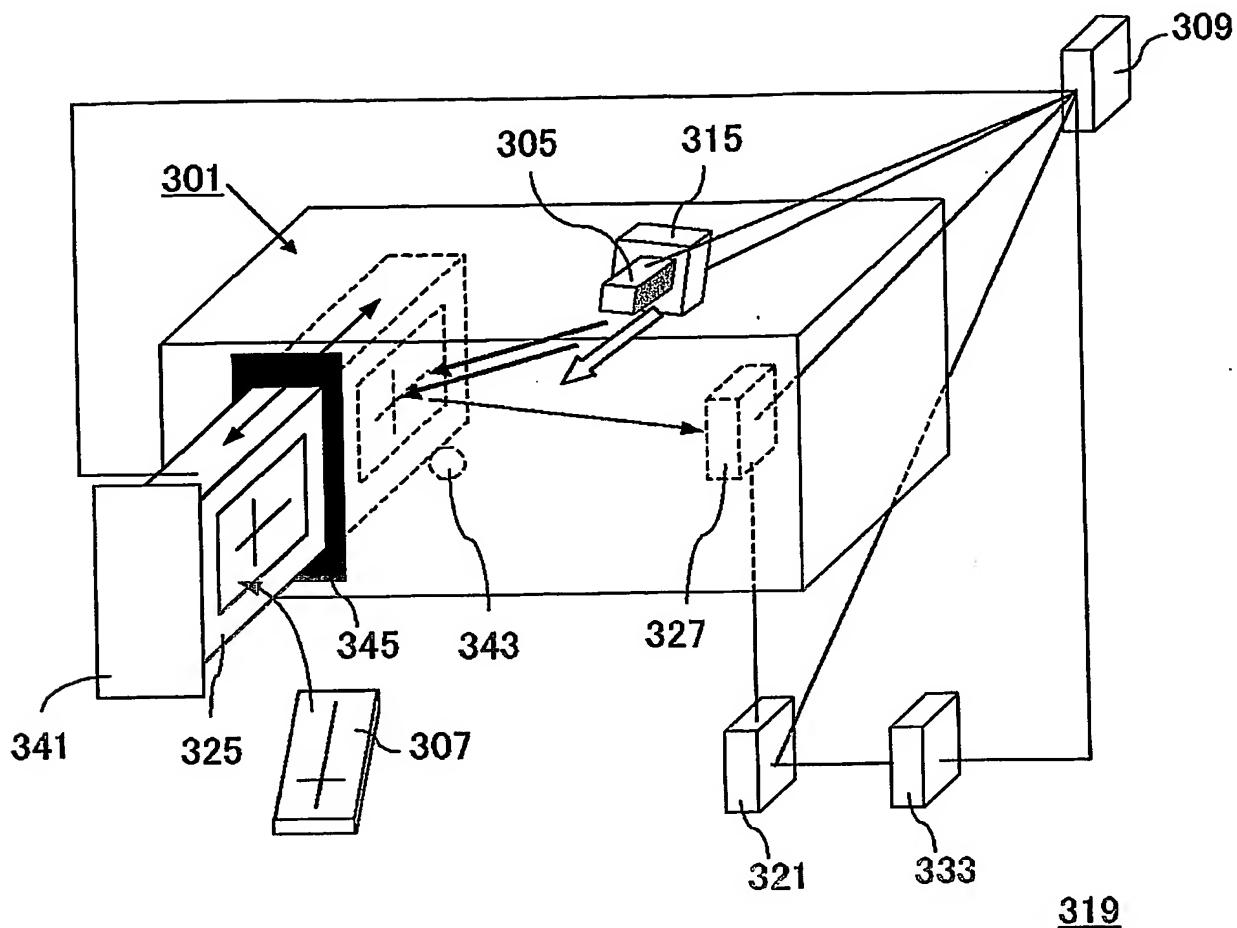


Fig.78

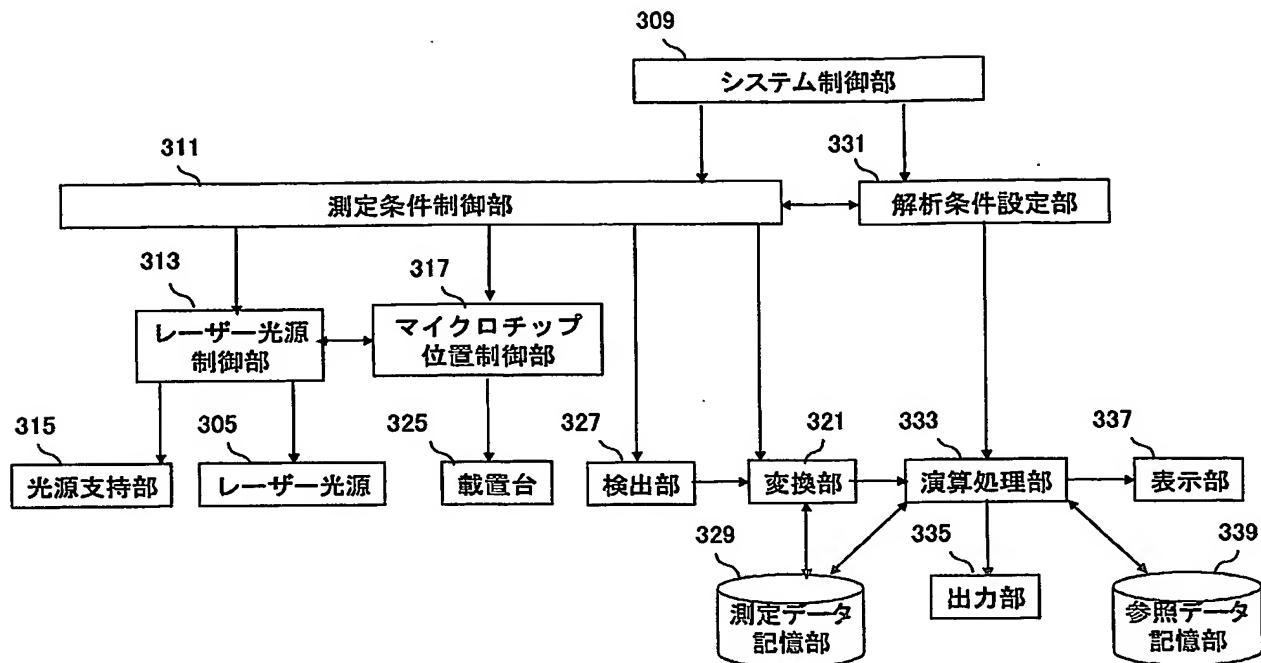


Fig.79

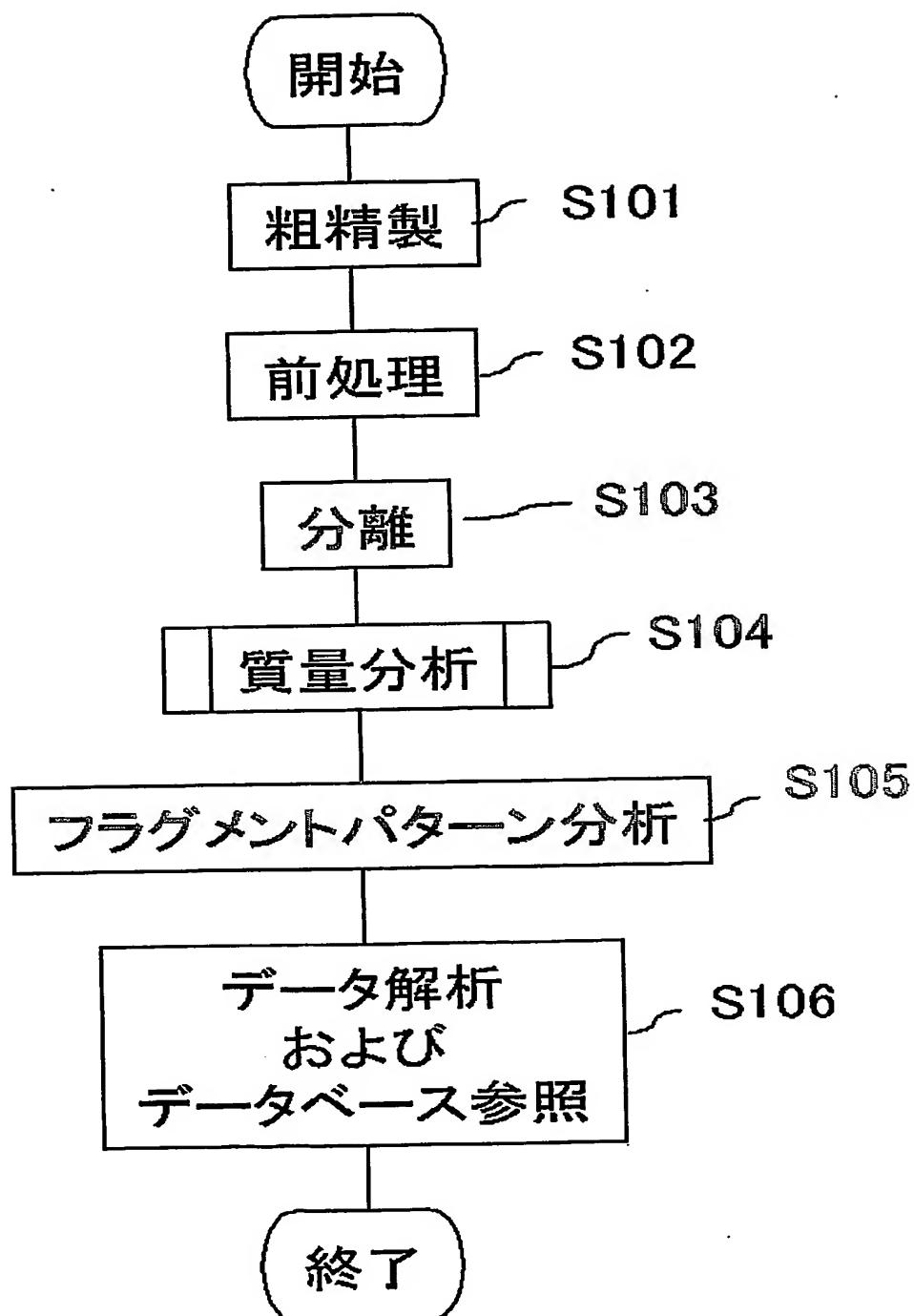
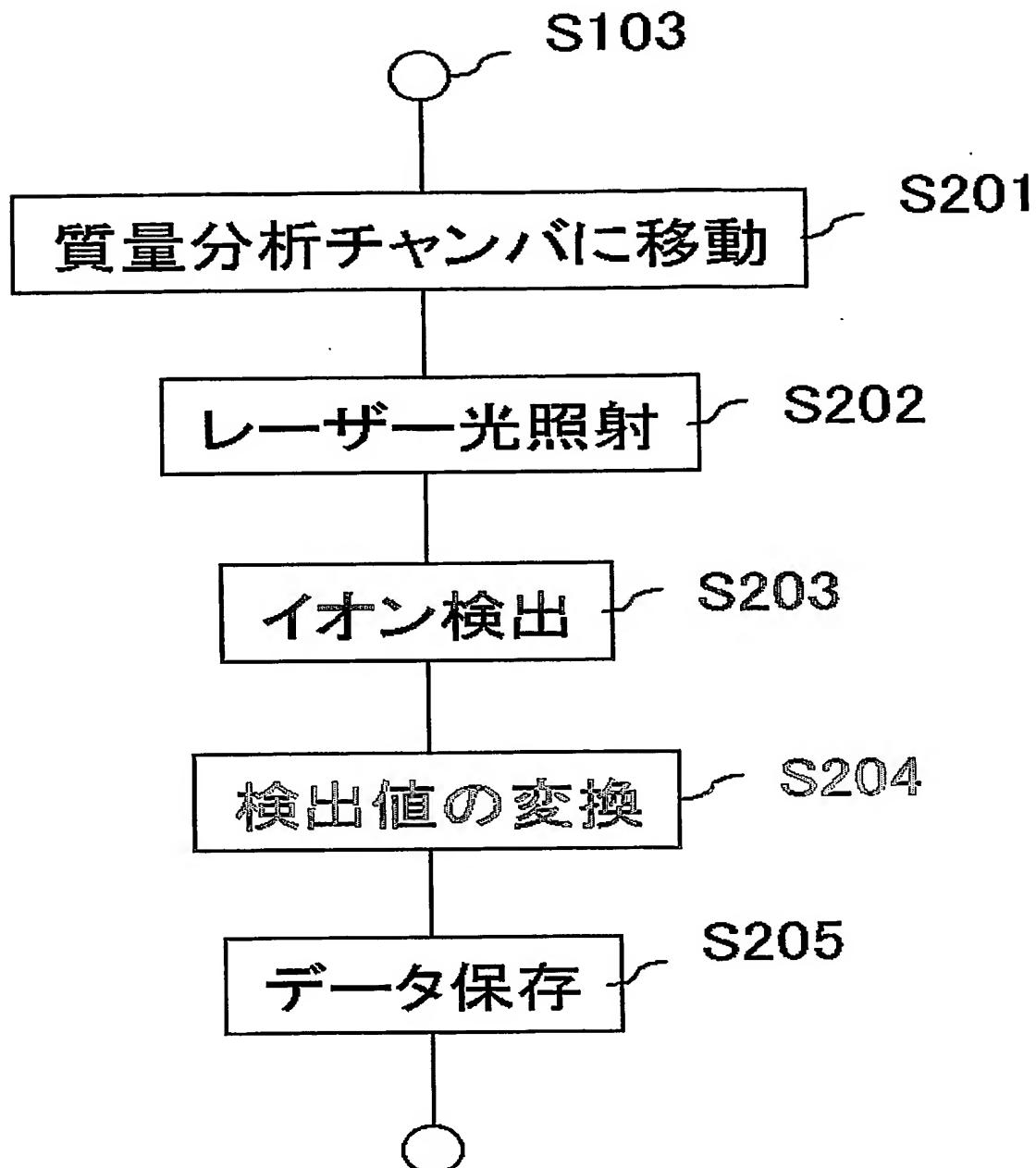


Fig.80



S104

Fig.81

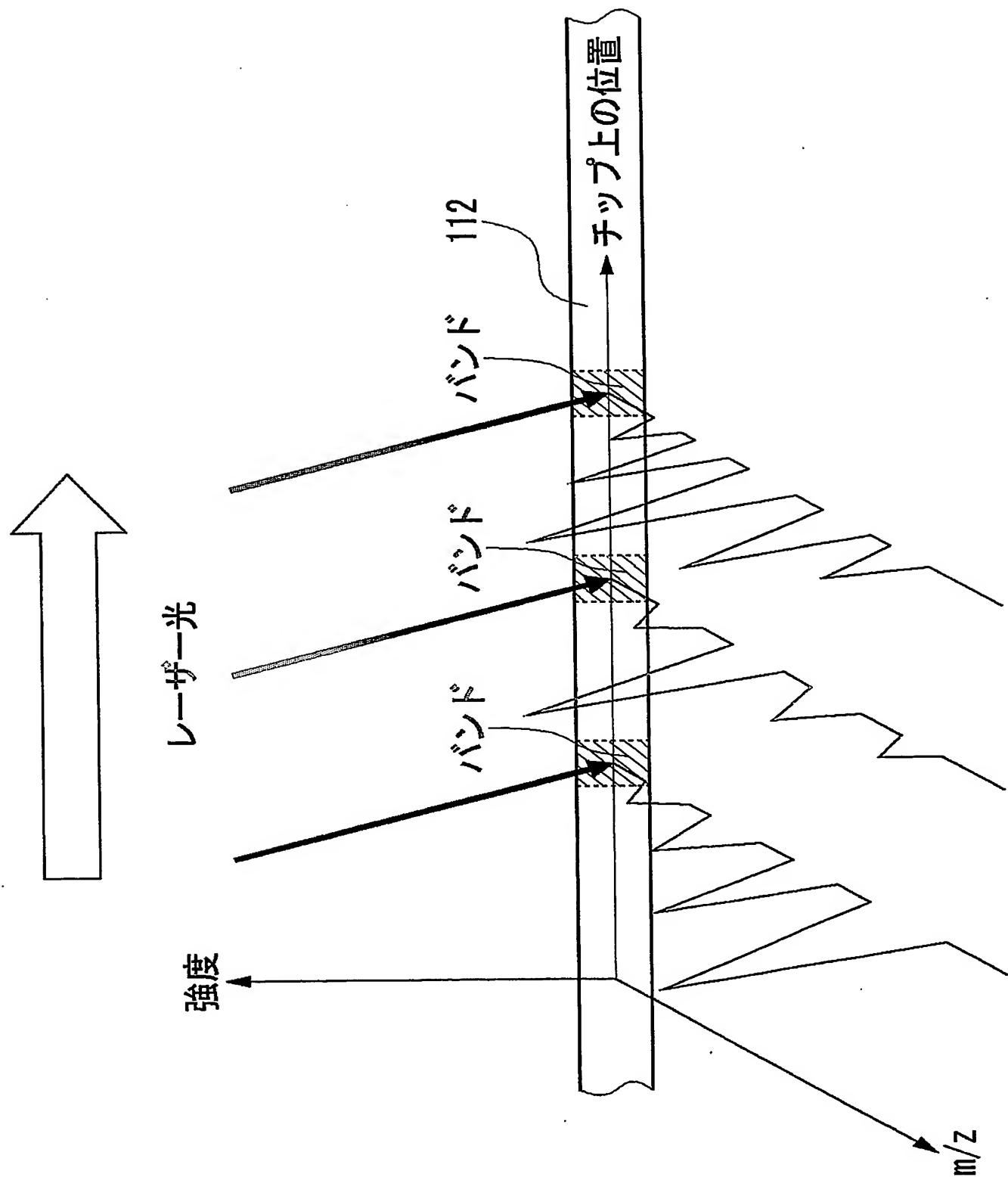


Fig.82

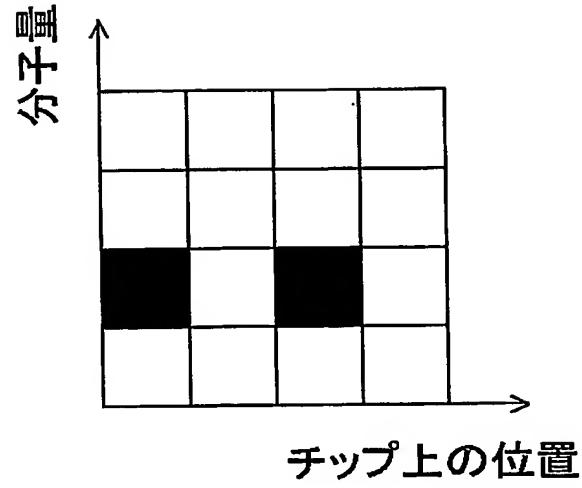
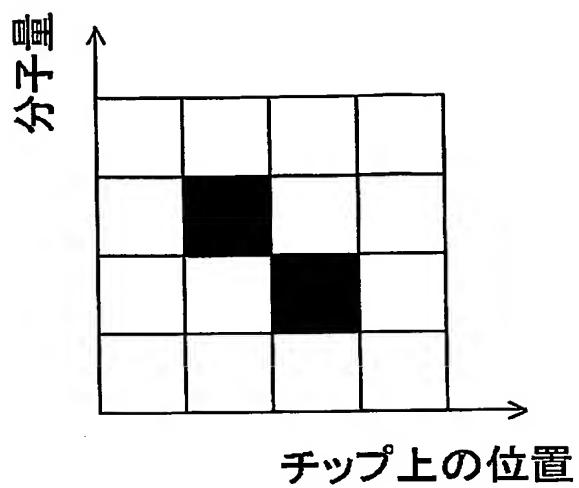


Fig.83

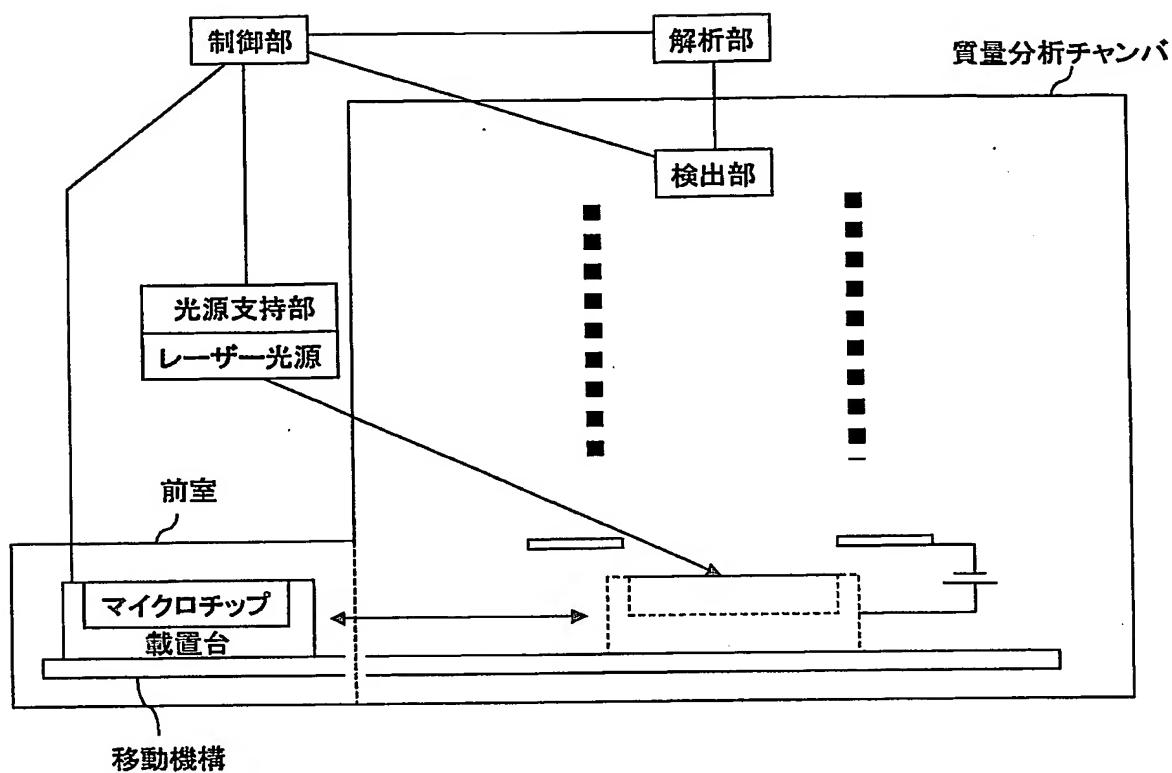
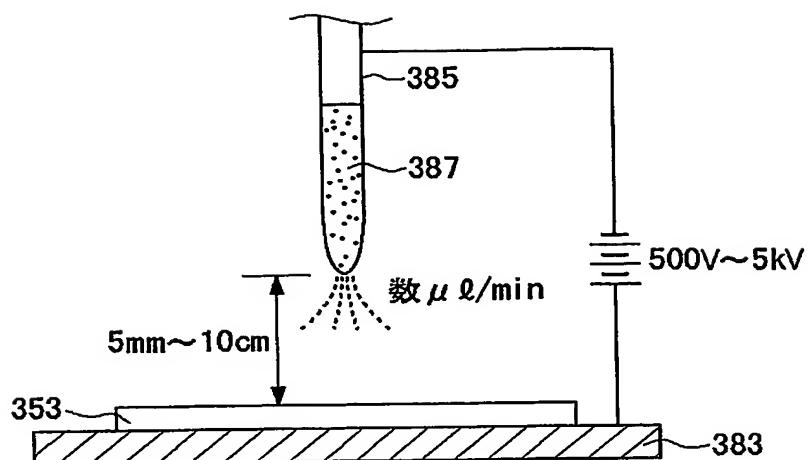
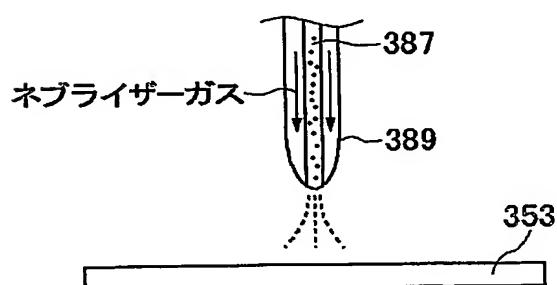


Fig.84

(a)



(b)



(c)

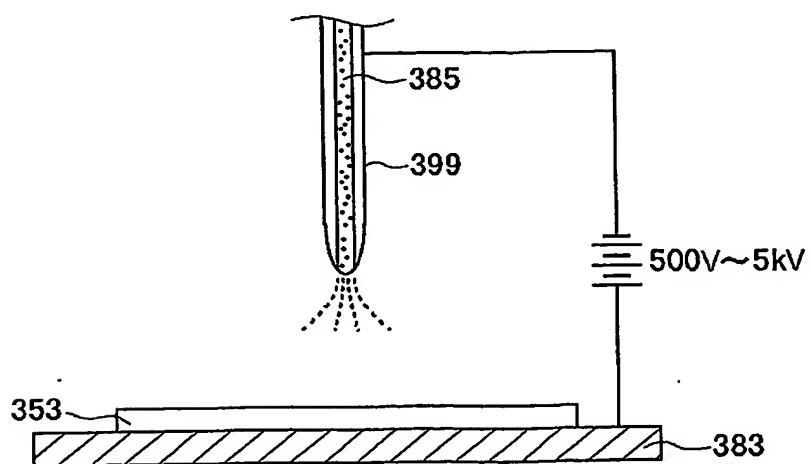
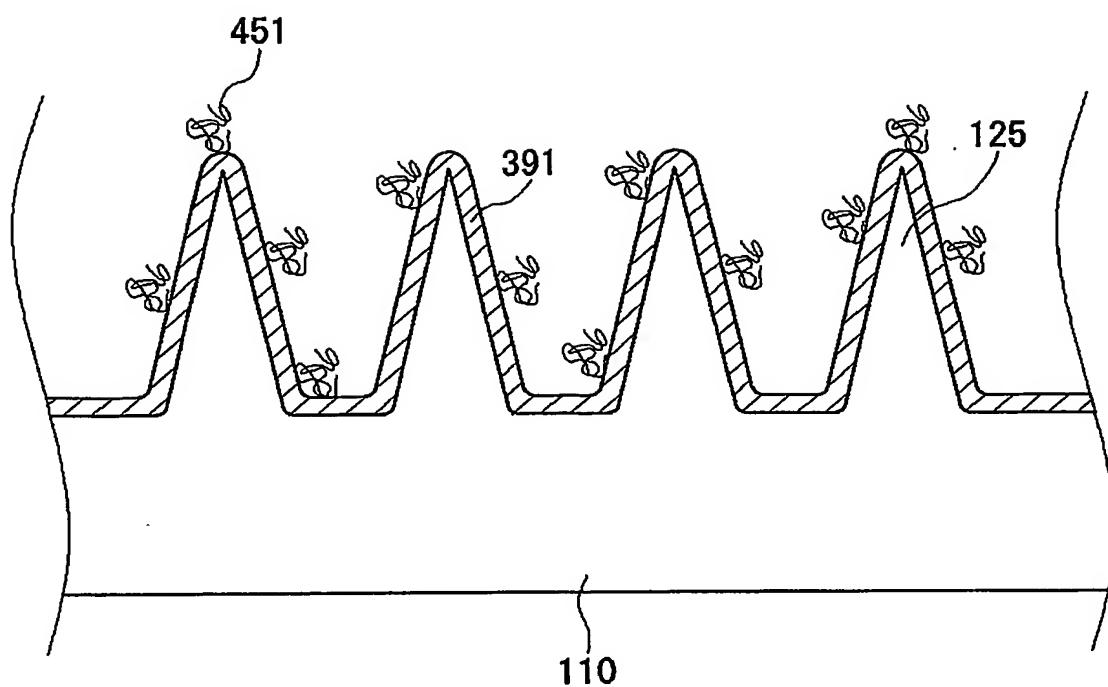


Fig.85

(a)



(b)

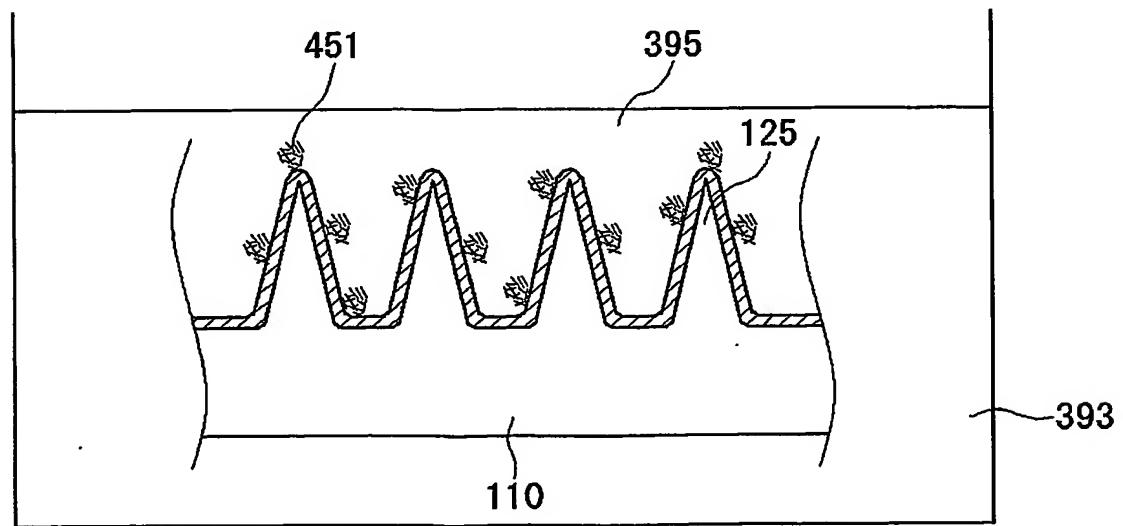
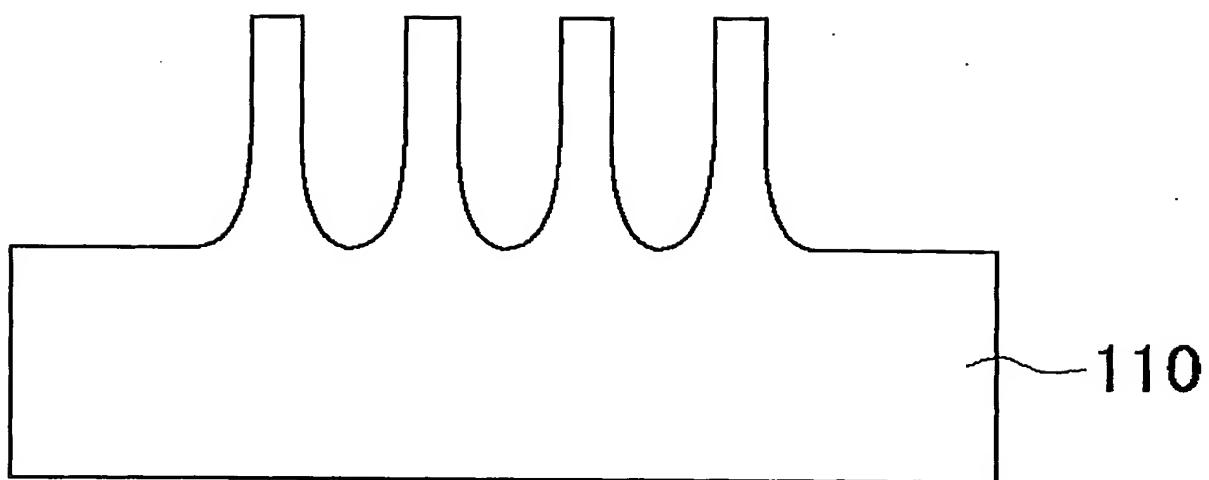


Fig.86

(a)



(b)

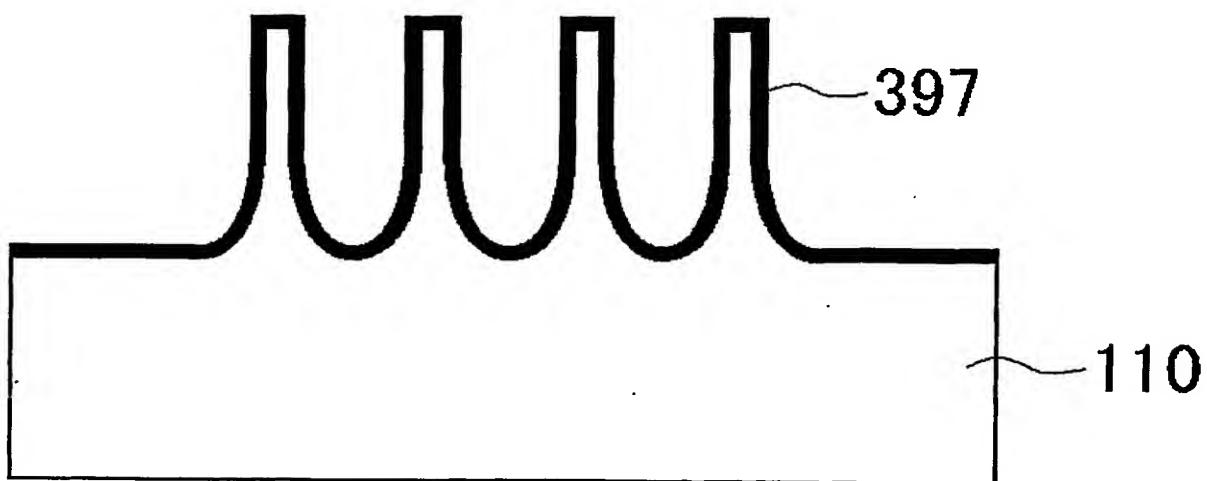
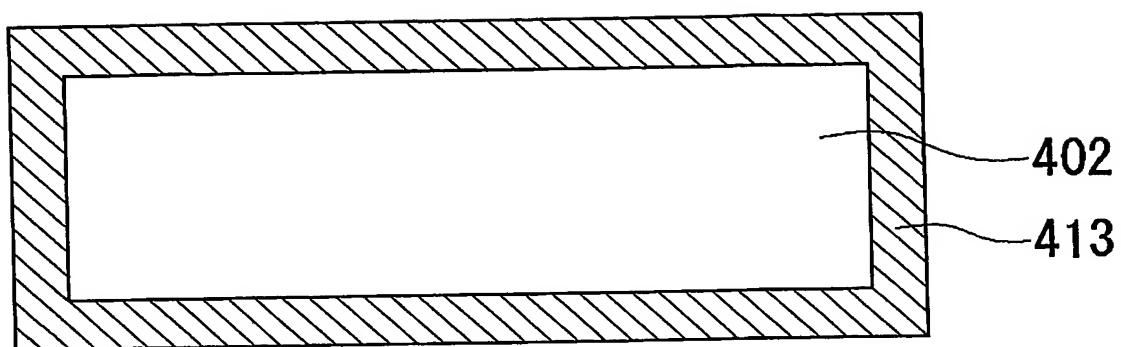
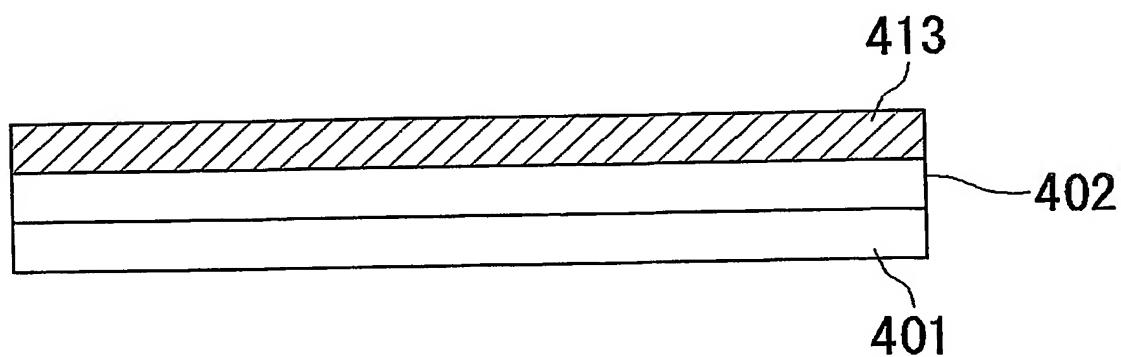


Fig.87

(a)



(b)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003427

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' G01N27/64, G01N30/60, G01N30/56, G01N30/72, G01N37/00,  
G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' G01N27/62-27/70, G01N30/00-30/96, G01N27/447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), Web of Science

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-264297 A (Hitachi, Ltd.), 26 September, 2001 (26.09.01), Claims 1 to 5; Par. Nos. [0002] to [0011], [0018] to [0019]; Figs. 1, 5 (Family: none)	1-4, 13-20, 33-53 5-12, 14-16
Y	K. Fukui et al., "ESI-FTICR MS With Infrared Multiphoton Dissociation: Analysis of Fragmentation of Peptides", Proceedings of the 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 2002, Session Code: TPE, Slot: 116	1-4, 13-20, 33-53

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 April, 2004 (09.04.04)Date of mailing of the international search report  
27 April, 2004 (27.04.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<p>International application No. PCT/JP2004/003427</p>
--

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/068952 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 06 September, 2002 (06.09.02), Claims 1 to 28; Fig. 1 & JP 2002-328114 A & EP 1376120 A	1-4, 13-20, 33-53
Y	WO 00/15321 A (ADVANCED BIOANALYTICAL SERVICES), 23 March, 2000 (23.03.00), Description, page 30, line 18 to page 44, line 27; Figs. 25 to 45 & EP 1113850 A	1-4, 13, 17-20, 33-42, 46-49
Y	WO 01/02093 A2 (3M INNOVATIVE PROPERTIES CO.), 11 January, 2001 (11.01.01), Description, page 12, line 9 to page 16, line 24; page 23, lines 11 to 23; page 33, lines 6 to 21; Figs. 1a to 1j, 4 & EP 1196243 A & JP 2003-503715 A	14-16
Y	JP 2002-311007 A (Hitachi Instruments Service Co., Ltd.), 23 October, 2002 (23.10.02), Par. Nos. [0006] to [0012]; Figs. 1, 2 (Family: none)	34-36
Y	JP 63-318061 A (Shimizu Corp.), 26 December, 1988 (26.12.88), Page 1, lower left column, lines 5 to 16 (Family: none)	42, 49, 53
Y	JP 2002-365177 A (Proteom Systems Ltd.), 18 December, 2002 (18.12.02), Par. Nos. [0001] to [0004] (Family: none)	47, 51
Y	JP 11-64283 A (JEOL Ltd.), 05 March, 1999 (05.03.99), Par. Nos. [0019], [0023] to [0024]; Fig. 2 (Family: none)	48, 52
P,A	WO 03/044519 A (NEC Corp.), 30 May, 2003 (30.05.03), Claims 1 to 19; Figs. 1 to 17 (Family: none)	21-32

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N27/64, G01N30/60, G01N30/56, G01N30/72, G01N37/00, G01N27/447

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N27/62-27/70, G01N30/00-30/96, G01N27/447

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JICSTファイル (JOIS), Web of Science

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP 2001-264297 A (株式会社日立製作所) 2001.09.26 請求項1-5, 段落【0002】-【0011】，【0018】-【0019】，第1,5図 (ファミリーなし)	1-4, 13-20, 33-53 5-12, 14-16
Y	K. Fukui <i>et al.</i> , "ESI-FTICR MS With Infrared Multiphoton Dissociation : Analysis of Fragmentation of Peptides", Proceedings of the 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 2002, Session Code: TPE, Slot: 116	1-4, 13-20, 33-53

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.04.2004

国際調査報告の発送日

27.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高場 正光

2W 2910

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/068952 A (理化学研究所) 2002.09.06 請求の範囲1-28, 第1図 & JP 2002-328114 A & EP 1376120 A	1-4, 13-20, 33-53
Y	WO 00/15321 A (ADVANCED BIOANALYTICAL SERVICES) 2000.03.23 明細書第30頁第18行—第44頁第27行, 第25-45図 & EP 1113850 A	1-4, 13, 17-20, 33-42, 46-49
Y	WO 01/02093 A2 (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 2001.01.11 明細書第12頁第9行—第16頁第24行, 第23頁第11行—第23行, 第33頁第6行—第21行, 第1a—1j, 4図 & EP 1196243 A & JP 2003-503715 A	14-16
Y	JP 2002-311007 A (日立計測器サービス株式会社) 2002.10.23 段落【0006】-【0012】，第1,2図（ファミリーなし）	34-36
Y	JP 63-318061 A (株式会社島津製作所) 1988.12.26 第1頁左下欄第5—16行（ファミリーなし）	42, 49, 53
Y	JP 2002-365177 A (プロテオム システムズ リミテッド) 2002.12.18 段落【0001】-【0004】（ファミリーなし）	47, 51
Y	JP 11-64283 A (日本電子株式会社) 1999.03.05 段落【0019】，【0023】-【0024】，第2図（ファミリーなし）	48, 52
P, A	WO 03/044519 A (日本電気株式会社) 2003.05.30 請求の範囲1-19, 第1-17図（ファミリーなし）	21-32